(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin.
Direktor: Geh. Hofrat Prof. Dr. Martin Hahn.)

Zur Bedeutung des Peptons als Nährsubstrat aerober Bakterien.

Die Verwertung des Peptons durch Staphylococcus aureus.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
genehmigt von der Philosophischen Fakultät
der Friedrich-Wilhelm-Universität zu Berlin
von

Adolph W. Müller
aus Hamburg.

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 1933.
Tag der Promotion: 14. Oktober 1933.

18

Referenten:
Prof. Dr. Kurt Noack
Prof. Dr. Ernst Gilg

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhalt.

I. Einleitung (S. 443).
II. Methoden und Vorversuche (S. 448).
III. Der Gehalt verschiedener Peptonpräparate an Gesamtstickstoff, Amino-Stickstoff und Ammoniak-Stickstoff (S. 451).
IV. Die Ausnutzung der freien Aminogruppen des Peptons durch *Staphylococcus aureus*. (Die oxydative Desaminierung des Peptons.)
a) Die Bedeutung der Aerobiose für den Peptonumsatz (S. 456).
b) Die quantitative Beziehung zwischen freien Aminogruppen und Ammoniakproduktion (S. 457).
c) Vergleichende Versuche mit anderen Erregern (S. 462).
V. Die Beziehung zwischen Ammoniakproduktion und Keimzahl (S. 463).
VI. Die Abgrenzung der verschiedenen physiologischen Funktionen des Peptons als Nährsubstrat für *Staphylococcus aureus*.
a) Die Differenzierung der energetischen und stofflichen Ausnutzung des Peptons (S. 465).
b) Die Ersetzbarkeit der energetischen Funktion des Peptons durch chemisch definierte Substanzen (S. 468).
c) Die Ersetzbarkeit der stofflichen (assimilatorischen) Funktion des Peptons durch chemisch definierte Substanzen (S. 471).
d) Die im Pepton enthaltenen Reizstoffe für die initiale Keimvermehrung (S. 471).
e) Vergleichende Versuche mit anderen stimulierenden Substanzen (S. 477).
VII. Der Einfluß der Belüftung auf die Vermehrung von *Staphylococcus aureus* in reinen Peptonlösungen (S. 479).
VIII. Zur physiologischen Bedeutung der sogenannten Extraktivstoffe in peptonhaltiger Nährbouillon (S. 484).
IX. Allgemeine Ergebnisse (S. 490).

I. Einleitung.

Zur Frage nach der Verwertbarkeit verschiedener stickstoffhaltiger Substanzen durch Mikroorganismen für den *Aufbau* der Zelleiber und als *Energiequelle* liegen eine große Zahl von Beobachtungen vor. In der

Reihe, welche vom atmosphärischen Stickstoff über die N-haltigen Mineralsalze und über die einfachen organischen Stickstoffverbindungen, wie Harnstoff, Purinderivate, Aminosäuren, bis zu den komplexen Eiweißabbauprodukten, den Albumosen und Peptonen, und schließlich zu hochmolekularen nativen Eiweißstoffen führt, ist kaum eine Substanz bekannt, welche nicht irgendeinem Mikroorganismus als Material zum Protoplasmaaufbau und — soweit chemisch und thermodynamisch möglich — auch als Energiequelle dienen kann.

Andererseits muß hervorgehoben werden, daß die Verwertbarkeit bestimmter stickstoffhaltiger Substanzen oder Substanzgruppen durchaus auf bestimmte Bakterienspezies beschränkt bleiben kann, so daß vielfach die Ausnutzbarkeit der einen oder der anderen stickstoffhaltigen Verbindung zur bakteriologischen Differentialdiagnose dient.

Die Tatsache, daß in sehr vielen Fällen eine stickstoffhaltige Substanz *gleichzeitig* für den Stoffwechsel und für den Energiewechsel herangezogen wird, hat häufig in der Beurteilung der „Ausnutzbarkeit" solcher Substanzen zu Unklarheiten Anlaß gegeben. Da zum Aufbau von Zelleiweiß stets N-haltiges Material erforderlich ist, so mag dies der Grund dafür sein, daß zumeist die rein stoffliche (assimilatorische) Verwertung so sehr in den Vordergrund der Betrachtung gerückt ist, daß die energetische Ausnutzung dieser Stoffe häufig übersehen wurde. So entwickelt z. B. *Alexander Janke*[1] in der Einleitung zu einem Sammelreferat über den Aminosäureabbau durch Mikroben die Vorstellung, der Abbau der Aminosäuren sei bei den meisten Phytomikroben darauf zurückzuführen, daß sie anscheinend Aminosäuren nicht unmittelbar zur Synthese arteigener Proteine zu verwerten vermögen, und daß sie den Abbau bis zum Ammoniak durchführen, um aus diesem dann den Aufbau ihrer spezifischen Eiweißstoffe vorzunehmen. Eine ähnliche Anschauung äußert *S. Kostytschew* in seinem Lehrbuch der Pflanzenphysiologie[2]. Für eine beschränkte Zahl von Erregern, die Ammoniak zur Eiweißsynthese verwerten können, mag die Desaminierung von Aminosäuren diese Rolle einer Vorbereitung zum Zellaufbau spielen. Auf jeden Fall wird nur ein außerordentlich geringer Teil des abgespaltenen Ammoniaks zur Synthese verwertet, so daß diese Verwendungsart den *Umfang* der Desaminierung keineswegs ausreichend erklärt.

Aus den Erfahrungen der Literatur und aus den nachfolgenden eigenen Beobachtungen geht hervor, daß die Desaminierung bei zahlreichen Mikroben weniger assimilatorischen als *energetischen* Zwecken dient. Dies gilt jedenfalls für die oxydative, exotherm verlaufende Ab-

[1] *Alexander Janke*, Arch. Mikrobiol. **1**, 304 (1930).

[2] *S. Kostytschew*, Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. Bd. 1, S. 377. Berlin: Julius Springer 1926.

spaltung von Ammoniak, die bei den obligaten und fakultativen Aerobiern weit verbreitet ist. Hierbei handelt es sich oft um Mikroorganismen, die gar nicht in der Lage sind, Ammoniak zu assimilieren, sondern zum Aufbau ihrer Leibessubstanz auf höhere Eiweißabbauprodukte, wie Aminosäuren, Polypeptide, Peptone usw., angewiesen sind. Gerade bei diesen — hinsichtlich der Stickstoffquelle — anspruchsvolleren Mikroorganismen liegt die Bedeutung der Desaminierung ausschließlich in der dissimilatorischen Leistung der Energiegewinnung. Aus diesen Überlegungen geht hervor, daß man bei der Beurteilung des Umsatzes stickstoffhaltiger Substanzen durch Mikroorganismen bestrebt sein muß, zwischen der Verwendung zur Zellsynthese und einer möglichen Verwendung zur Energiegewinnung zu unterscheiden.

Neben den Umsetzungen von stickstoffhaltigen Substanzen, welche den *eigentlichen* Stoff- und Energiewechsel bedeuten, rufen zahlreiche Mikroorganismen an höheren Eiweißstoffen bzw. an komplexen Eiweißabbauprodukten Veränderungen hervor, die auf der Einwirkung freier oder an die Zellen gebundener hydrolysierender Fermente[1] beruhen. Diese Hydrolysen von stickstoffhaltigem Material durch die sogenannten Hydrolasen haben hinsichtlich des Stoff- und Energiewechsels höchstens die Bedeutung einer vorbereitenden Zerlegung. Einer solchen fermentativen Hydrolyse begegnen wir auch bei der energetischen Ausnutzung von Polysacchariden, die zu diesem Zweck vorher in Monosaccharide zerlegt werden müssen. Wir dürfen deshalb die Leistungen dieser Bakterienenzyme ebensowenig in die Betrachtung des eigentlichen Stoff- und Energiewechsels einbeziehen, wie z. B. die Wirkungen der Darmenzyme bei höheren tierischen Organismen, welche die zugeführten Nährstoffe erst in assimilierbare bzw. in energetisch ausnutzbare Bestandteile aufspalten.

Die nachfolgenden Untersuchungen liefern einen Beitrag zur Frage des Stickstoffumsatzes durch pathogene Kokken; sie wurden auf Anregung von Herrn Geh. Hofrat Prof. Dr. *Martin Hahn* unternommen und knüpfen an Befunde an, die in den Jahren 1926 bis 1928 im Hygienischen Institut der Universität Berlin von *Julius Hirsch* am *Vibrio cholerae* erhoben worden sind. Aus diesen früheren Arbeiten[2] geht hervor, daß der *Vibrio cholerae* imstande ist, aus Asparaginsäure als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle seinen gesamten Stoff- und Energiebedarf zu decken. Die energieliefernde Dissimilation beginnt damit, daß durch *oxydative Desaminierung* zunächst Ammoniak abgespalten wird. Der stickstoffreie Rest unterliegt einer weiteren Sprengung und Oxydation zu Essigsäure und Kohlensäure. Der assimilatorischen Verwertung der Asparaginsäure, d. h. ihrer Umwandlung in Eiweißsubstanzen, geht *keine* Desaminierung voraus. Das ergibt sich daraus, daß

[1] Ausführliche Literatur siehe *C. Oppenheimer*, Die Fermente. 5. Aufl. Bd 2, S. 1129. 1926; *R. E. Buchanan* u. *E. I. Fulmer*, Physiology and Biochemistry of Bacteria. Bd. 3, S. 97. London 1930; *Marjory Stephenson*, Bacterial Metabolism. S. 81. London 1930.

[2] *Julius Hirsch*, Z. Hyg. **106**, 433 (1926) [1]; **109**, 387 (1928) [2].

anorganische Ammoniumsalze für den Choleraerreger keine brauchbare Stickstoffquelle sind, wie denn auch — nach Zusatz von Glykose als bevorzugter Energiequelle — die Desaminierung unterdrückt wird und eine Keimvermehrung ohne Abspaltung von Ammoniak stattfindet. Im Hinblick auf die nachfolgenden Versuche muß als wesentlichster Befund hervorgehoben werden, daß die *energetische* Ausnutzung der Asparaginsäure durch Choleravibrionen *primär an eine oxydative Abspaltung der Aminosäuren geknüpft ist.*

Hirsch hat seine Untersuchungen auf einfachen — chemisch definierten — Nährböden durchgeführt und konnte den Chemismus des Aminosäureabbaus durch quantitative Bestimmung aller Stoffwechselendprodukte ermitteln. Die Benutzung synthetischer Nährmedien bietet für die chemische Untersuchung von Stoffwechselleistungen der Mikroorganismen denkbar günstige Bedingungen. Dies zeigen vor allem auch die ergebnisreichen Arbeiten von *H. Braun*[1] über den Verwendungsstoffwechsel pathogener Erreger sowie die Studien des englischen Forschers *J. H. Quastel* über die biochemischen Leistungen der sog. „ruhenden Bakterien"[2]. Naturgemäß bleibt die Anwendung chemisch definierter Substanzen als Nährsubstrat auf diejenigen Erreger beschränkt, welche mit dem dargebotenen Material als Stoff- und Energiequelle auskommen. Das trifft in erster Linie für eine große Zahl von (nicht pathogenen) Saprophyten zu. Hingegen scheitert die Fortzüchtung zahlreicher pathogener Bakterien auf synthetischen Medien häufig daran, daß sie zum Aufbau ihrer Leibessubstanz hochwertige Eiweißabbauprodukte benötigen. Dementsprechend konnten die seit jeher in der Praxis des bakteriologischen Laboratoriums — in Form der Nährbouillon — benutzten Fleischextrakte und Peptone bisher nicht durch eine synthetische Universallösung ersetzt werden.

Über die Differenzierung zwischen der assimilatorischen und der dissimilatorischen Verwendung der Peptone und über die sich dabei abspielenden biochemischen Vorgänge ist nicht allzuviel bekannt. Aus der praktischen Erfahrung heraus weiß man zwar, daß dieses oder jenes Peptonpräparat sich für besondere Zwecke und für bestimmte Erreger ausgezeichnet eignet. Andererseits bietet die Technik der Peptongewinnung und die Inkonstanz des Ausgangsmaterials nicht immer eine sichere Gewähr dafür, daß die verschiedenen Chargen ein und desselben Handelsproduktes gleichmäßig ausfallen, so daß die Untersuchungen über den chemischen Abbau und Umbau der Peptone

---

[1] Literatur siehe *H. Braun*, In Abderhalden, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. XII, Tl 2, H. 1. Berlin 1930.

[2] *J. H. Quastel*, J. of Hyg. **28** (1928); Transact. Faraday Soc. **1930**; In F. F. Nord und E. Weidenhagen, Ergebnisse der Enzymforschung. Bd. 1, S. 209. Leipzig 1932.

bei der Bakterienzüchtung mit sehr erheblichen Schwierigkeiten verknüpft sind.

Im Hinblick auf die Bedeutung der oxydativen Desaminierung für die energetische Verwertung von Aminosäuren, die sich aus den Beobachtungen von *J. Hirsch* an Choleravibrionen ergibt, haben wir uns zunächst einmal die Frage gestellt, ob sich bei der energetischen Dissimilation der Peptone an den vorhandenen Aminogruppen analoge Vorgänge abspielen.

Über die Abspaltung von Ammoniak aus peptonhaltigen Nährmedien liegen zahlreiche Beobachtungen vor[1]. Die bakterielle Ammoniakproduktion hat von jeher als Zeichen der „Eiweißzersetzung" gegolten, und es ist bekannt, daß bei Gegenwart von Glykose die Ammoniakbildung weitgehend zurückgedrängt bzw. völlig unterdrückt wird. Dieses Phänomen der „Eiweißeinsparung"[2] liefert ein Indizium dafür, daß die Ammoniakproduktion aus Pepton in einem wesentlichen Umfang mit der Energiegewinnung verknüpft ist.

In Analogie zur Desaminierung der Aminosäuren müßte sich die *Ammoniakabspaltung aus Peptonen an den freien Aminogruppen abspielen*. Unter dieser Voraussetzung war zu erwarten, daß für die energetische Ausnutzung von Peptonen die Menge der vorhandenen freien Aminogruppen maßgebend ist. Dies gilt jedoch nur für solche Erreger, welche *nicht* in der Lage sind, durch Tryptasen bzw. Peptidasen die dargebotenen Peptone so zu zerlegen, daß neue Aminogruppen auftreten. Aus den Untersuchungen von *G. I. Hucker* und *L. F. Rettger* über die Verwertung der hydrolytischen Eiweißabbauprodukte durch Mikrokokken[3] und aus den nachfolgend angeführten Beobachtungen geht hervor, daß der *Staphylococcus aureus* zu dieser Gruppe von Mikroorganismen gehört. Eine Analyse des Peptonumsatzes von *Staphylococcus aureus* läßt demnach eine Klärung der Frage nach der energetischen Verwertung des Peptons — im Sinne der obigen Annahme — erwarten.

Die nachfolgenden Ergebnisse liefern einen Beitrag zur Kenntnis der energetischen Ausnutzung des Peptons. Es war möglich, für den Fall des *Staphylococcus aureus* die energetische Funktion des Peptons gegen die stoffliche (assimilatorische) Funktion scharf abzugrenzen. Ferner wurde neben der energetischen und der stofflichen Bedeutung

---

[1] Siehe vor allem *A. I. Kendall* und Mitarbeiter, Schriftenverzeichnis bei *Buchanan* u. *Fulmer*, l. c. Bd. 3, S. 470—473; *G. I. Hucker* u. *L. F. Rettger*, Zbl. Bakter. II Orig. **65**, 118 (1925); *H. Glinka-Tschernorutzky*, Biochem. Z. **206**, 301, 308 (1929); **221**, 113, 125 (1930) u. a.

[2] Literatur siehe bei *Marjory Stephenson*, l. c. 187.

[3] *G. I. Hucker* u. *L. F. Rettger*, l. c.

des Peptons für die Keimvermehrung eine dritte, spezielle Wirkung auf die Vermehrungsgeschwindigkeit aufgezeigt. Der oxydative Charakter der energetischen Peptonausnutzung wurde durch die quantitative Abhängigkeit des Substratumsatzes und der damit verknüpften Keimvermehrung von der Sauerstoffversorgung bestätigt. Schließlich konnte die Wirkungsweise der Extraktivstoffe des Muskelfleisches (Fleischwasser), aus denen zusammen mit Pepton die übliche Nährbouillon bereitet wird, auf Grund der gewonnenen Erfahrungen näher umrissen werden.

II. Methoden und Vorversuche.

Zur Untersuchung des Stickstoffumsatzes durch pathogene Kokken wurde ein in der Sammlung des Hygienischen Institutes der Universität Berlin seit Jahren fortgezüchteter Stamm *Staphylococcus aureus* „O" herangezogen.

Die ersten orientierenden Versuche beschäftigten sich mit der Frage, ob die Fortzüchtung des *Staphylococcus aureus* auf chemisch definierten Nährlösungen möglich ist. Über die Vermehrung pathogener Kokken auf synthetischen Nährmedien liegt nur *eine* positive Angabe in der Literatur vor. *A. Lübbert*[1] gibt an, eine Reihe fortlaufender Kulturen von pyogenen Staphylokokken auf einer Nährlösung erzielt zu haben, welche als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle *Kreatin* enthielt. Wir haben diesen Befund nicht bestätigen können. Bezüglich der Verwertung anderer chemisch definierter Nährsubstrate erhielten wir die gleichen negativen Ergebnisse wie sie *G. I. Hucker* und *L. F. Rettger*[2] sowie *F. Krasnow*[3] bei der Prüfung einer großen Reihe von chemischen Verbindungen beschrieben haben. Es wird auf diese Versuche später noch einmal einzugehen sein.

Nach diesen Befunden scheint der *Staphylococcus aureus* zu denjenigen Erregern zu gehören, die bezüglich der Stickstoffquellen zu den anspruchsvolleren Mikroorganismen gehören, insofern sie auf die Anwesenheit komplexerer Eiweißabbauprodukte angewiesen sind. Zur Beantwortung der Frage nach der energetischen und stofflichen Ausnutzung des Peptons in Bakterienkulturen schien demnach die Untersuchung der Stoffwechselleistungen von *Staphylococcus aureus* in Peptonlösungen durchaus geeignet.

Bei der Verwendung von Peptonlösungen verschiedener Konzentrationen wurde das jeweilige Präparat in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und erhielt einen Zusatz von 10% einer mol/15 Phosphat-

---

[1] *A. Lübbert*, Biologische Spaltpilzuntersuchungen. Der *Staphylococcus pyogenes aureus*, 1886.

[2] *G. I. Hucker* u. *L. F. Rettger*, Zbl. Bakter. II Orig. **65**, 273 (1925).

[3] *F. Krasnow* u. Mitarbeiter, J. Bacter. **12**, Nr 6 (1929) — Dent. Res. **9** (1929).

pufferlösung nach Sörensen. Die H-Ionenkonzentration wurde auf p_H 7,6 eingestellt.

Als Ausgangsmaterial für die Peptonlösungen dienten verschiedene Handelspräparate, die über Phosphorpentoxyd im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet worden waren. Benutzt wurden verschiedene Chargen von *Pepton Chapoteaut*, *Pepton Riedel* und *Pepton Witte*. Die verschiedenen Peptonsorten zeigten erhebliche Unterschiede bezüglich ihrer Löslichkeit. Die später folgenden analytischen Daten über die Zusammensetzung der Peptone mußten daher ohne Berücksichtigung des unlöslichen Anteils erfolgen.

Die Bereitung der Lösungen geschah nach folgendem Gang: Eine abgewogene Menge des getrockneten Präparates wurde in kaltem Wasser aufgeschwemmt, die erforderliche Menge Phosphatpuffer zugesetzt und 45 Minuten im Dampftopf erhitzt. Nach Abkühlung der Lösung wurde die H-Ionenkonzentration geprüft und gegebenenfalls korrigiert. Der Niederschlag von braunen Flocken wurde durch Filtration mittels eines Seitz-Bakterienfilters entfernt. Da bei den verschiedenen Peptonpräparaten der Gehalt des trockenen Pulvers an Gesamtstickstoff bestimmt worden war, konnten die gewünschten Peptonkonzentrationen durch Ergänzung mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt werden, nachdem der Gesamtstickstoffgehalt der Lösung festgestellt worden war. Die fertigen Lösungen wurden durch zweimaliges Erhitzen im Dampftopf einer fraktionierten Sterilisation unterworfen. Zur Verwendung gelangten nur vollkommen klare Lösungen.

Die Beimpfung geschah von einer 24stündigen Schrägagarkultur, die mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt wurde. Zu je 100 ccm Kulturlösung wurde ein Tropfen Bakteriensuspension zugesetzt.

Diese approximativ gleichmäßige Beimpfung wurde bald durch ein exakteres Verfahren ersetzt. Die von *W. Strauss*[1] ausgearbeitete Methode der Keimzählung mittels objektiver Nephelometrie durch den Mollschen Trübungsmesser erwies sich als ein ausgezeichnetes Verfahren, um mit einer zuverlässig bestimmten Menge von Erregern zu beimpfen. In einigen Kontrollversuchen haben wir durch Vergleichsmessungen und Zählungen mittels der Thoma-Zeiss'schen Kammer die Genauigkeit der Methode bestätigen können. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 wiedergegeben.

Entsprechend der in der Einleitung entwickelten Fragestellung erstreckte sich die chemische Charakterisierung der verschiedenen Peptonpräparate auf die Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes, des Gehaltes an Amino-Stickstoff und an Ammoniak-Stickstoff. Die

[1] *W. Strauss*, Zbl. Bakter. I Orig. **115** (1930).

Tabelle 1.

Nach Stunden	Beimpft mit $20 \cdot 10^6$ nephelometr. best. Keimen/ccm Peptonkonzentrationen			
	100 mg/ccm		50 mg/ccm	
	Gezählt	Gemessen	Gezählt	Gemessen
	Keimzahl, Millionen/ccm			
24	300	310	138	139
48	268	235	139	123
72	280	282	130	130
120	260	256	109	107

Ermittelung des Gesamtstickstoffs wurde nach der von *Pregl*[1] angegebenen Mikro-Kjeldahl-Methode mittels der Apparatur von *Parnas* und *Wagner* durchgeführt. Der Amino-Stickstoff wurde gasvolumetrisch nach *van Slyke*[2] bestimmt, und zwar in einer Apparatur mit einer Meßbürette von 10 ccm Fassungsvermögen (Halbmikro).

Wir hatten versucht, die Reihenbestimmung des Amino-Stickstoffs nach *O. Folin*[3] mittels α-Naphthochinonsulfosäure vorzunehmen. Dieses colorimetrische Verfahren zeigte in Vorversuchen mit Aminosäuren eine ausreichende Genauigkeit. Bei der Bestimmung des Amino-Stickstoffs in Peptonlösungen traten jedoch Trübungen auf, welche jeden colorimetrischen Vergleich unmöglich machten.

Die Bestimmung des Ammoniak-Stickstoffs wurde nach der Vorschrift von *Krüger* und *Reich*[4] durchgeführt. Unter Zusatz von Kalkmilch und Alkohol wird das Ammoniak im Vakuum bei 30—40 mm Hg und etwa 42° übergetrieben und in einem mit $^n/_{100}$-Salzsäure beschickten Peligotrohr aufgefangen. Aus dem Verbrauch an $^n/_{100}$-HCl wird die Menge des Ammoniak-Stickstoffs berechnet. Die vorgeschriebene Kühlung des Peligotrohrs mittels Eiswasser haben wir durch eine Berieselung ersetzt. Zwischen die beiden Schenkel des Rohres wurde ein Schlauch gehängt, der in einem T-Stück endigte; durch diese Vorrichtung wurden die beiden Kugeln des Peligotrohrs gleichmäßig mit kaltem Wasser umspült. Probebestimmungen ergaben einen ausreichenden Abkühlungseffekt.

Um die Genauigkeit und die Übereinstimmung der Methoden zu überprüfen, wurde der Stickstoffgehalt verschiedener Aminosäurelösungen sowohl nach *Kjeldahl* wie nach *van Slyke* in Parallelanalysen untersucht.

---

[1] *Pregl*, Die quantitative organische Mikroanalyse. 3. Aufl. S. 123. Berlin 1930.

[2] *D. van Slyke*, In Abderhalden, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. I, Tl 7, S. 53. 1922.

[3] *O. Folin*, J. of biol. Chem. **51**, 377 (1922) — Ebenda **51**, 393 (1922).

[4] Vgl. *T. Péterfi*, Methodik der wissenschaftlichen Biologie. Bd 2, S. 1123. Berlin 1928.

Tabelle 2.

Bestimmung von Stickstoff nach *Kjeldahl* und nach *van Slyke*.

In 2 ccm etwa 0,5 proz.	Nach *Kjeldahl* mg N	Nach *van Slyke* mg N
Asparaginsäurelösung	0,997	0,999
Glutaminsäurelösung	1,001	0,989

Die Ergebnisse aus beiden Methoden zeigen eine ausreichende Übereinstimmung

Zur Untersuchung der Frage, ob bei der Bestimmung des Amino-Stickstoffs in der von *van Slyke* vorgeschriebenen Zeit von 5 Minuten die freien Aminogruppen vollständig erfaßt werden, wurden Parallelbestimmungen durchgeführt, in denen 15 bzw. 30 Minuten geschüttelt wurde. Die Resultate waren übereinstimmend.

Tabelle 3.

1. Probe	5 Minuten	geschüttelt	ergab	3,112 mg NH_2-N
2. „	15 „	„	„	3,055 mg NH_2-N
3. „	30 „	„	„	3,142 mg NH_2-N

Weitere methodische Vorversuche waren erforderlich zur Prüfung der Frage, ob die Dauer der Destillation bei der Ammoniakbestimmung — durch etwaige allmähliche Zersetzung des Peptons in der alkalischen Lösung — nicht zu unscharfen Resultaten führt. Von einer bereits mit *Staphylococcus aureus* bewachsenen Peptonlösung, in welcher eine partielle Desaminierung eingetreten war, wurden nacheinander gleiche Mengen der Ammoniakbestimmung unterworfen, und zwar derart, daß nach Beendigung einer Destillation die nächste Probe eingeführt wurde, ohne daß der Rückstand der vorhergehenden entfernt worden war. Die aufgefundenen Ammoniakwerte von zwei bzw. drei aufeinanderfolgenden Analysen stimmen gut überein, so daß selbst bei längerer (etwa einstündiger) Destillation und Einwirkung von Kalkmilch keine zusätzliche Ammoniakabspaltung nachzuweisen war.

Tabelle 4.

I. Reihe:	1. Probe = 3,122 mg NH_3-N	
	2. „ = 3,116 mg NH_3-N	(mit dem Rückstand von 1 destilliert)
II. Reihe:	1. Probe = 1,560 mg NH_3-N	
	2. „ = 1,560 mg NH_3-N	(mit dem Rückstand von 1 destilliert)
	3. „ = 1,530 mg NH_3-N	(mit dem Rückstand von 1 u. 2 destill.)

III. Der Gehalt verschiedener Peptonpräparate an Gesamtstickstoff, Amino-Stickstoff und Ammoniak-Stickstoff.

Zur Analyse gelangten je zwei zu verschiedenen Zeiten bezogene Lieferungen von Pepton Chapoteaut (I und II), Pepton Riedel (I und II) und Pepton Witte (I und II). Die Bestimmungen wurden in 1 proz. Lösungen durchgeführt, welche nach dem eingangs beschriebenen Verfahren hergestellt wurden. Kleine Flüssigkeitsmengen wurden nicht pipettiert, sondern eingewogen. Zur Konservierung wurden die Lösungen nach Zusatz von 3 Tropfen Toluol zu 500 ccm im Eisschrank aufbewahrt.

Tabelle 5a.

Pepton Chapoteaut I.

Gesamtstickstoff.

	1 ccm 1 proz. Lösung = $^n/_{100}$-HCl ccm	100 mg Substanz = Gesamt-N mg
a)	10,23	14,33
b)	10,62	14,87
c)	10,31	14,44
d)	10,24	14,35
e)	10,35	14,50
f)	10,35	14,50

Mittelwert: *14,50 mg N* in 100 mg

Tabelle 5b.

Pepton Chapoteaut II

Gesamtstickstoff

	1 ccm 1 proz. Lösung = $^n/_{100}$-HCl ccm	100 mg Substanz = Gesamt-N mg
a)	10,13	14,18
b)	10,04	14,07
c)	10,20	14,29

Mittelwert: *14,18 mg N* in 100 mg

Amino-Stickstoff

	10 ccm 1 proz. Lösung = N_2 ccm *	100 mg Substanz = NH_2-N mg
a)	5,43	3,119
b)	5,50	3,159
c)	5,37	3,084
d)	5,50	3,159
e)	5,37	3,084

Mittelwert: *3,121 mg NH_2-N* in 100 mg

* gemessen bei 771 mm Hg und 21°; Leerwert 0,60 ccm

Amino-Stickstoff

	10 ccm 1 proz. Lösung = N_2 ccm *	100 mg Substanz = NH_2-N mg
a)	4,01	2,264
b)	3,97	2,242
c)	4,00	2,259

Mittelwert: *2,255 mg NH_2-N* in 100 mg

* gemessen bei 762 mm Hg und 22°; Leerwert 0,70 ccm.

Ammoniak-Stickstoff

100 ccm 1 proz. Lösung = $^n/_{100}$-HCl	100 mg Substanz = NH_3-N

Drei Bestimmungen ergaben Titrationswerte, welche (innerhalb der Fehlergrenze) der vorgelegten Menge an $^n/_{100}$-HCl entsprachen. Mithin enthielt das Präparat praktisch *keinen Ammoniak-Stickstoff*

Ammoniak-Stickstoff

	100 ccm 1 proz. Lösung = $^n/_{100}$-HCl ccm	100 mg Substanz = NH_3-N mg
a)	12,46	0,1764
b)	12,52	0,1754
c)	12,50	0,1751

Mittelwert: *0,1756 mg NH_3-N* in 100 mg

Tabelle 6a.

Pepton Riedel I

Gesamtstickstoff

1 ccm 1 proz. Lösung = $^n/_{100}$-HCl	100 mg Substanz = Gesamt-N
ccm	mg
a) 10,85	15,21
b) 10,69	14,97
c) 10,64	14,91
d) 10,59	14,83

Mittelwert: *14,98 mg N* in 100 mg

Amino-Stickstoff

10 ccm 1 proz. Lösung = N_2	100 mg Substanz = NH_2-N
ccm*	mg
a) 3,22	1,857
b) 3,28	1,890
c) 3,22	1,857
d) 3,18	1,832

Mittelwert: *1,859 mg NH_2-N* in 100 mg

* gemessen bei 770 mm Hg und 20°; Leerwert 0,75 ccm

Ammoniak-Stickstoff

100 ccm 1 proz. Lösung = $^n/_{100}$-HCl	100 mg Substanz = NH_3-N
ccm	mg
a) 3,57	0,050
b) 3,78	0,053
c) 3,28	0,046
d) 3,64	0,051

Mittelwert: *0,050 mg NH_3-N* in 100 mg

Tabelle 6b.

Pepton Riedel II

Gesamtstickstoff

1 ccm 1 proz. Lösung = $^n/_{100}$-HCl	100 mg Substanz = Gesamt-N
ccm	mg
a) 8,31	11,64
b) 8,31	11,64
c) 8,30	11,63

Mittelwert: *11,64 mg N* in 100 mg

Amino-Stickstoff

10 ccm 1 proz. Lösung = N_2	100 mg Substanz = NH_2-N
ccm*	mg
a) 2,46	1,402
b) 2,49	1,418
c) 2,46	1,402

Mittelwert: *1,407 mg NH_2-N* in 100 mg

* gemessen bei 772 mm Hg und 23°; Leerwert 0,60 ccm.

Ammoniak-Stickstoff

100 ccm 1 proz. Lösung = $^n/_{100}$-HCl	100 mg Substanz = NH_3-N
ccm	mg
a) 9,56	0,134
b) 9,63	0,135
c) 9,66	0,135
d) 9,62	0,135

Mittelwert: *0,135 mg NH_3-N* in 100 mg

Tabelle 7a.

Pepton Witte I

Gesamtstickstoff

1 ccm 1 proz. Lösung = $^n/_{100}$-HCl ccm	100 mg Substanz = Gesamt-N mg
a) 10,05	14,08
b) 10,07	14,11
c) 10,06	14,09
d) 10,04	14,07
e) 10,03	14,05

Mittelwert: *14,08 mg N* in 100 mg

Amino-Stickstoff

10 ccm 1 proz. Lösung = N_2 ccm*	100 mg Substanz = NH_2-N mg
a) 3,27	1,852
b) 3,27	1,852
c) 2,89	1,637
d) 3,17	1,795
e) 3,00	1,699

Mittelwert: *1,767 mg NH_2-N* in 100 mg

* gemessen bei 764 mm Hg und 22°; Leerwert 0,75 ccm.

Ammoniak-Stickstoff

100 ccm 1 proz. Lösung = $^n/_{100}$-HCl ccm	100 mg Substanz = NH_3-N mg
a) 6,90	0,0966
b) 6,86	0,0961
c) 6,73	0,0943
d) 6,82	0,0956

Mittelwert: *0,0956 mg NH_3-N* in 100 mg

Tabelle 7b.

Pepton Witte II

Gesamtstickstoff

1 ccm 1 proz. Lösung = $^n/_{100}$-HCl ccm	100 mg Substanz = Gesamt-N mg
a) 10,14	14,20
b) 10,12	14,17
c) 10,09	14,13

Mittelwert: *14,17 mg N* in 100 mg

Amino-Stickstoff

10 ccm 1 proz. Lösung = N_2 ccm*	100 mg Substanz = NH_2-N mg
a) 3,22	1,818
b) 3,26	1,841
c) 3,26	1,841

Mittelwert: *1,833 mg NH_2-N* in 100 g

* gemessen bei 762 mm Hg und 22°; Leerwert 0,70 ccm.

Ammoniak-Stickstoff

100 ccm 1 proz. Lösung = $^n/_{100}$-HCl ccm	100 mg Substanz = NH_3-N mg
a) 5,20	0,0729
b) 5,28	0,0740
c) 5,30	0,0743

Mittelwert: *0,0737 mg NH_3-N* in 100 g

Die Ergebnisse der vorstehenden Analysenzahlen wurden in der folgenden Übersichtstabelle zusammengefaßt.

Tabelle 8.

(Übersichtstabelle aus den Tabellen 5—7.)

In 100 mg Pepton	Pepton Chapoteaut		Pepton Riedel		Pepton Witte	
	I	II	I	II	I	II
Gesamt-N	14,50 mg	14,18 mg	14,98 mg	11,64 mg	14,08 mg	14,17 mg
Amino-N	3,12 mg	2,26 mg	1,86 mg	1,41 mg	1,77 mg	1,83 mg
d. s. Prozent des Gesamt-N. . .	21,50%	15,94%	12,41%	12,09%	12,57%	12,94%
Ammoniak-N . .	0,00 mg	0,176 mg	0,050 mg	0,135 mg	0,096 mg	0,074 mg
d. s. Prozent des Gesamt-N. . .	0,00%	1,24%	0,33%	1,16%	0,68%	0,52%

Die Zusammenstellung der Analysenzahlen zeigt, daß die von uns untersuchten Peptonsorten eine sehr weitgehende Übereinstimmung in ihrem Gehalt an Gesamt-N aufweisen; lediglich eine Charge von Pepton Riedel zeigt einen etwas niedrigeren Gesamt-N-Wert. Hinsichtlich des Gehaltes an freien Aminogruppen, welcher uns bei unserer Fragestellung besonders interessiert, ist festzustellen, daß das französische Präparat Pepton Chapoteaut die größte Menge enthält; doch zeigt der Gehalt zweier Chargen erhebliche Unterschiede. Der Amino-Stickstoffgehalt der beiden deutschen Peptonsorten ist in den untersuchten Chargen gleichmäßig und konstant. Der Ammoniakgehalt ist sehr gering und beträgt höchstens etwas mehr als 1% des Gesamt-N; das Auftreten von Ammoniak dürfte in erster Linie von der Beschaffenheit des Ausgangsmaterials abhängen.

Der Unterschied zwischen Pepton Chapoteaut einerseits und den Peptonen Riedel und Witte andererseits, welcher sich chemisch in dem Gehalt an freien Aminogruppen nachweisen ließ, zeigte sich auch in dem physikalischen Verhalten der verschiedenen Peptonlösungen bei der gasvolumetrischen Bestimmung nach *van Slyke*. Beim Ausschütteln der Gase schäumten die Lösungen der deutschen Präparate viel stärker als entsprechende Lösungen von Pepton Chapoteaut. Dieser Unterschied in der Oberflächenspannung dürfte auf einem verschiedenen Gehalt an hochmolekularen Eiweißabbauprodukten beruhen, also auf einem verschiedenen Grade der Aufspaltung, welcher bereits aus den chemischen Daten hervorgeht.

IV. Die Ausnutzung der freien Aminogruppen des Peptons durch Staphylococcus aureus. (Die oxydative Desaminierung des Peptons.)

a) Die Bedeutung der Aerobiose für den Peptonumsatz.

Die eingangs begründete Annahme, daß die energetische Verwendung des Peptons durch *Staphylococcus aureus* analog der Ausnutzung von Asparaginsäure durch den Choleraerreger verläuft, haben wir zunächst in einer qualitativen Versuchsanordnung geprüft, wie sie *J. Hirsch*[1] bei seinen Studien über den Stoffwechsel des *Vibrio cholerae* beschrieben hat.

Dem Prinzip dieser Methode entsprechend wurden Kulturen von *Staphylococcus aureus* in reinen Peptonlösungen unter aeroben und streng anaeroben Bedingungen bei 37° bebrütet. Zum Vergleich wurden Peptonkulturen mit einem Zusatz von Glykose in gleicher Weise angesetzt. Aus der Erfahrung, daß Staphylokokken in der Lage sind, Glykose unter Bildung von Milchsäure — also durch eine (anoxybiontische) Glykolyse — energetisch zu verwerten, war zu erwarten, daß die zuckerhaltigen Kulturen sowohl unter aeroben wie unter anaeroben Bedingungen zur Entwicklung kamen. Dagegen konnte eine Vermehrung der Staphylokokken auf reinen (kohlehydratfreien) Peptonlösungen unter anaeroben Bedingungen nicht erwartet werden, wenn nämlich die energetische Ausnutzung des Peptons — ähnlich wie die der Aminosäuren durch Choleravibrionen — ausschließlich auf *oxydativem* Wege erfolgt. Neben der Schätzung der Keimvermehrung haben wir gleichzeitig mittels Nesslerschem Reagenz geprüft, in welchen Ansätzen eine Ammoniakabspaltung stattfand.

Die aeroben Kulturen wurden in einer Schichthöhe von etwa 6 bis 8 mm in Erlenmeyer-Kolben angesetzt. Die anaeroben Kulturen wurden — nach dem Verfahren von *Hirsch* — in Reagenzgläsern im Stickstoffstrome eingeschmolzen. Die Ablesung der Ergebnisse erfolgte 24 Stunden nach der Beimpfung; diese sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 9.

Pepton Chap. I	Glykose	Aerob		Anaerob	
%	%	Keimvermehrung	NH_3	Keimvermehrung	NH_3
0,2	—	+	+	—	—
0,2	0,5	+	—	+	—

Auf reinem Peptonwasser erfolgt eine Keimvermehrung *nur* bei Zufuhr von Luftsauerstoff, wobei Ammoniak abgespalten wird. Auf zuckerhaltigem Peptonwasser geht die Kultur unter aeroben, wie auch unter anaeroben Bedingungen an; eine Abspaltung von Ammoniak ist nicht festzustellen.

[1] *J. Hirsch*, l. c. (2).

b) Die quantitative Beziehung zwischen freien Aminogruppen und Ammoniakproduktion.

Nachdem durch die vorhergehende Versuchsreihe gezeigt worden war, daß die Verwendung von Pepton allein als Nährstoff durch Staphylokokken an die Gegenwart von Luftsauerstoff geknüpft ist, wurde in weiteren Versuchen die Frage nach der Entstehung des Ammoniaks aus dem Pepton verfolgt. Der fraglos oxydative Charakter dieser Umsetzung legte es — wie schon wiederholt gesagt — nahe, die Ammoniakentstehung auf eine oxydative Abspaltung aus freien Aminogruppen zurückzuführen. Unter der Voraussetzung, daß der *Staphylococcus aureus* lediglich die vorhandenen freien Aminogruppen angreift, und nicht durch tiefergehende Umsetzungen und Spaltungen neue Aminogruppen aus peptidartigen Bindungen freilegt, durfte somit die Menge des abgespaltenen Ammoniak-Stickstoffs die Menge des in der Ausgangslösung vorhandenen Amino-Stickstoffs nicht überschreiten. Die nachfolgende Tab. 10 bringt die Ergebnisse von Versuchen, in denen die Ammoniakproduktion bei verschiedenen Konzentrationen von Pepton Chapoteaut I in Beziehung zu dem vorhandenen Amino-Stickstoff gesetzt wurde. Die Züchtung geschah in Fernbach-Kolben mit einem Bodendurchmesser von etwa 250 mm in einer Schichthöhe von etwa 10 mm.

Tabelle 10.

Pepton Chapoteaut I in 100 ccm		Dauer der Bebrütung	Ammoniak-N in 100 ccm	= % des Ausgangs-NH_2-N
Substanz mg	NH_2-N mg	Std.	mg	
50	1,56	48	1,177	
			1,208	
			D 1,193	76,5
100	3,12	48	2,43	
			2,38	
			D 2,41	77,3
200	6,24	48	3,11	
			2,99	
			D 3,05	48,9
300	9,36	48	3,56	
			3,62	
			D 3,59	38,4
400	12,48	48	3,94	
			3,92	
			D 3,93	31,5
50	1,56	72	1,225	
			1,225	
			1,200	
			D 1,217	78,0

Aus Tab. 10 geht hervor, daß in Peptonlösungen verschiedener Konzentration die Menge des entstandenen Ammoniaks stets innerhalb der Grenzen des in der Ausgangslösung vorhandenen Amino-Stickstoffs liegt. Damit ist zwar kein direkter Beweis für die Entstehung des Ammoniaks durch Abspaltung der vorhandenen freien Aminogruppen gegeben. Immerhin sprechen die Analysenzahlen nicht gegen eine mögliche genetische Verknüpfung von NH_3-N mit NH_2-N.

Hervorzuheben ist, daß mit abnehmender Konzentration der Peptonlösungen die Ammoniakwerte sich den — nach unserer Theorie — maximal möglichen Mengen nähern. Außerdem zeigt die nach 72 Stunden durchgeführte Bestimmung den höchsten prozentualen Ammoniakwert, bezogen auf das NH_2-Äquivalent der Ausgangslösung.

Tabelle 11. Ammoniakproduktion in belüfteten Peptonkulturen.

Pepton Chapoteaut I in 100 ccm		Dauer der Bebrütung	Ammoniak-N in 100 ccm	= % des Ausgangs-NH_2-N	
Substanz mg	NH_2-N mg	Std.	mg	%	
74,88	2,34	24	1,86	79,5	79,3
			1,85	79,0	
		48	2,10	89,7	90,4
			2,13	91,1	
		72	2,18	93,1	92,5
			2,15	91,8	
		120	2,29	97,8	97,6
			2,28	97,4	
104,0	3,24	72	3,26	100,6	100,2
			3,23	99,7	
		120	3,25	100,3	100,8
			3,28	101,2	
149,1	4,65	24	2,85	61,3	61,1
			2,83	60,9	
		48	3,22	69,2	69,4
			3,24	69,7	
		72	3,30	70,9	70,4
			3,25	69,9	
		96	3,51	75,4	75,5
			3,52	75,6	
1000,0	31,2	24	11,20	35,9	35,8
			11,12	35,6	
		48	21,24	68,1	67,9
			21,13	67,7	
		72	25,22	80,8	81,2
			25,46	81,6	

Wir stellten uns daher die Aufgabe, durch langfristige fortlaufende Untersuchung der Ammoniakproduktion die zeitliche Entstehung des Ammoniaks zu ermitteln und dabei gleichzeitig eine maximale NH_3-Bildung zu erzwingen. Erfahrungen über den Einfluß des Luftsauerstoffes auf die Keimvermehrung, über welche bereits kurz berichtet worden ist und auf die wir in einem späteren Zusammenhang auch in technischer Beziehung noch einmal näher einzugehen haben (s. S. 479) veranlaßten uns, eine Erhöhung des Stoffumsatzes durch Belüftung der Kulturmedien anzustreben. Eine vermehrte Sauerstoffzufuhr schien um so mehr angezeigt, als wir bereits (s. Tab. 9) Anhaltspunkte für den oxydativen Charakter der Ammoniakproduktion gewonnen haben. Zu bemerken ist, daß durch den Luftstrom niemals bestimmbare Ammoniakmengen aus der Kulturflüssigkeit ausgetrieben wurden, wie die stets durchgeführten Untersuchungen der nachgeschalteten Vorlagen von $^n/_{50}$ Schwefelsäure ergaben. Die Ergebnisse sind in der vorstehenden Tab. 11 zusammengefaßt.

Aus dem zeitlichen Verlauf der Ammoniakproduktion ergibt sich, daß die Hauptmenge innerhalb der ersten 48 Stunden entsteht; in der nachfolgenden Zeit ist die Ammoniakbildung pro Zeiteinheit außerordentlich verringert. In allen Konzentrationen des angewandten Pepton Chapoteaut I wird — selbst nach mehreren Tagen — nicht mehr Ammoniak-Stickstoff gefunden als der ursprünglich vorhandenen Menge an Amino-Stickstoff äquivalent ist.

Die folgenden Tabellen bringen weitere Ergebnisse mit anderen Peptonsorten.

In allen Peptonsorten werden die an Pepton Chapoteaut I erhobenen Befunde bestätigt. Wir fanden in allen Versuchsreihen, unabhängig von der Art und der Menge des angewandten Peptons, daß eine quantitative Beziehung der gefundenen Ammoniakmenge zum dargebotenen Amino-Stickstoff besteht. Die ermittelten Werte an Ammoniak-Stickstoff

Tabelle 12. Ammoniakproduktion in belüfteten Kulturen von Pepton Chapoteaut II.

Pepton Chapoteaut II in 100 ccm			Dauer der Bebrütung	Gesamt-NH_3-N	Abgespaltener NH_3-N	– % des Ausgangs-NH_2-N	
Substanz mg	NH_2-N mg	NH_3-N mg	Std.	mg	mg	%	
100,3	2,27	0,177	48	1,357	1,180	52,0	52,0
				1,355	1,178	51,9	
			96	1,487	1,310	57,7	57,5
				1,478	1,301	57,3	
191,5	4,33	0,337	72	2,771	2,434	56,2	55,8
				2,759	2,422	55,9	
				2,737	2,400	55,4	

Tabelle 13. Ammoniakproduktion in belüfteten Kulturen von Pepton Riedel II.

Pepton Riedel II in 100 ccm			Dauer der Bebrütung	Gesamt-NH_3-N	Abgespaltener NH_3-N	= % des Ausgangs-NH_2-N	
Substanz mg	NH_2-N mg	NH_3-N mg	Std.	mg	mg	%	
93,9	1,324	0,127	21	0,701	0,574	43,4	43,5
				0,703	0,576	43,5	
			48	0,706	0,579	43,7	43,3
				0,694	0,567	42,8	
			74	0,772	0,645	48,7	48,3
				0,762	0,635	47,9	
106,6	1,503	0,144	48	0,635	0,491	32,7	32,6
				0,632	0,488	32,5	
			96	0,670	0,526	35,0	34,7
				0,661	0,517	34,4	
201,2	2,836	0,272	72	1,014	0,742	26,2	26,2
				1,014	0,742	26,2	

Tabelle 14. Ammoniakproduktion in belüfteten Kulturen von Pepton Witte II.

Pepton Witte II in 100 ccm			Dauer der Bebrütung	Gesamt-NH_3-N	Abgespaltener NH_3-N	= % des Ausgangs-NH_2-N	
Substanz mg	NH_2-N mg	NH_3-N mg	Std.	mg	mg	%	
83,48	1,528	0,062	21	0,835	0,773	50,5	50,2
				0,826	0,764	49,9	
			48	0,835	0,773	50,5	50,3
				0,829	0,767	50,1	
			74	0,866	0,804	52,5	52,5
				0,866	0,804	52,5	
103,8	1,899	0,077	48	0,706	0,629	33,1	32,9
				0,698	0,621	32,7	
			96	0,777	0,700	36,9	36,9
				0,780	0,703	37,0	
181,8	3,332	0,135	72	1,105	0,970	29,1	29,0
				1,094	0,959	28,8	

liegen meist unter 100%, in einigen Fällen gerade bei 100%, niemals über 100% des Amino-Stickstoffs in der Ausgangslösung. Die stöchiometrische Beziehung zwischen Ammoniakproduktion und freien Aminogruppen, die sich in dieser Begrenzung der maximalen Ausbeute ausdrückt, liefert einen wichtigen Anhaltspunkt für den Chemismus, welcher der Abspaltung von Ammoniak aus Pepton durch den *Staphylococcus aureus* zugrunde liegt.

Trotz der großen Reihe der in dieser Hinsicht eindeutigen Befunde, darf der indirekte Charakter der Beweisführung nicht übersehen werden. Zur endgültigen Bestätigung der Entstehung des Ammoniaks durch *Desaminierung der freien Aminogruppen* mußte direkt nachgewiesen werden, daß in der Peptonlösung Amino-Stickstoff in dem Maße verschwindet wie Ammoniak gebildet wird.

Die experimentelle Aufgabe bestand demnach darin, daß in einer Peptonwasserkultur von *Staphylococcus aureus* nebeneinander die Menge des abgespaltenen Ammoniaks und die Menge der noch vorhandenen Aminogruppen quantitativ ermittelt wurden. Aus analytischen Gründen mußte mit einer relativ hochkonzentrierten (etwa 2proz.) Peptonlösung gearbeitet werden. Der nach der Ammoniak-Destillation im Kolben verbliebene Rückstand wurde mit Essigsäure vollständig in Lösung gebracht, weiter im Vakuum eingeengt und der Amino-N-Bestimmung nach *van Slyke* unterworfen. Als Substrat diente Pepton Chapoteaut II, das an Gesamt-N 14,18%, an Amino-N 2,26% und an präformiertem Ammoniak-N 0,176% enthielt.

Tabelle 15.

Die mit Staphylokokken beimpfte Lösung enthielt 2,087% Pepton Chapoteaut II, also in 100 ccm 47,18 mg Amino-N und 3,67 mg präformierten Ammoniak-N.

Dauer der Bebrütung	In 100 ccm Kulturflüssigkeit						
	Gesamt-NH_3-N	abgespaltener NH_3-N	= % des Ausgangs-NH_2-N (a)	noch vorhandener NH_2-N		= % des Ausgangs-NH_2-H (b)	(a + b)
Std.	mg	mg	%	mg		%	%
12	12,00 12,10 } 12,05	8,38	17,8	37,99 38,31 } 38,15		80,9	98,7
24	16,71 16,66 16,67 } 16,68	13,01	27,6	34,86 33,20 33,20 } 33,75		71,6	99,2

Die angeführte Versuchsreihe bringt den direkten Beweis für die Korrelation zwischen verschwundenem Amino-N und gebildetem Ammoniak-N. Die Summe aus abgespaltenem Ammoniak-Stickstoff und restierendem Amino-Stickstoff ergibt praktisch jedesmal 100% des ursprünglich vorhandenen (nach *van Slyke* bestimmbaren) Amino-Stickstoffs. Demnach ist die Entstehung von Ammoniak in aeroben Peptonwasserkulturen von *Staphylococcus aurens* lediglich auf eine Abspaltung freier Aminogruppen zurückzuführen. *Staphylococcus aureus* ist nicht imstande, aus dem Pepton andersartig gebundenen Stickstoff in Form von Ammoniak in Freiheit zu setzen.

c) Vergleichende Versuche mit anderen Erregern.

Im Gegensatz zum *Staphylococcus aureus* gibt es andere Erreger, welche durch tiefergreifende Zerlegung aus dem Pepton mehr Ammoniak abspalten, als der ursprünglich vorhandenen Menge an freien Aminogruppen entspricht. Im Verlauf unserer Untersuchungen war es uns in 2 Fällen möglich, Ammoniakmengen festzustellen, welche mehr als 100% des Ausgangs-NH_2-N entsprachen. In beiden Fällen ergab die bakteriologische Untersuchung eine Verunreinigung mit Gram-positiven, sporenbildenden, *Subtilis*-ähnlichen Erregern. In Tab. 16 sind die analytischen Daten angeführt.

Tabelle 16.

Pepton Chapoteaut I in 100 ccm mg	Dauer der Bebrütung Std.	Abgespaltener NH_3-N = % des Ausgangs-NH_2-N %	Bakteriologischer Befund
		1. Versuchsreihe	
97,0	24	59,1	Reinkultur Staphylokokken
	48	112,6	Mischkultur mit B. subtilis
	72	154,1	desgl.
	96	164,4	desgl.
		2. Versuchsreihe	
149,1	24	61,1	Reinkultur Staphylokokken
	48	69,4	desgl.
	72	70,4	desgl.
	96	75,5	desgl.
	120	96,1	Mischkultur mit B. subtilis
	168	141,1	desgl.

Bezüglich der 2. Versuchsreihe sei bemerkt, daß die Infektion der Staphylokokkenkultur mit *B. subtilis* sich zunächst dadurch bemerkbar macht, daß die praktisch zum Stillstand gekommene Ammoniakproduktion nach 96 Stunden erneut einsetzt, um dann, ebenso wie in der 1. Versuchsreihe, den Wert des NH_2-N-Äquivalentes um 40% bzw. 60% zu überschreiten. Der Befund, daß *B. subtilis* höhere Eiweißkomplexe hydrolytisch spaltet und dadurch neue Aminogruppen zur Desaminierung freilegt, steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von *G. G. de Bord*[1], daß dieser Erreger auf zuckerhaltigen Peptonlösungen die Zahl der freien Aminogruppen vermehrt.

Andererseits konnte gelegentlich einer Verunreinigung einer Staphylokokken-Peptonwasserkultur durch einen *Sarcina*-ähnlichen Luftkeim

[1] *G. G. de Bord*, J. Bacter. **8**, 7 (1923).

festgestellt werden, daß dieser Erreger — in gleicher Weise wie *Staphylococcus aureus* — nicht mehr Ammoniak liefert, als der vorhandenen Menge freier Aminogruppen entspricht. Der betreffende Luftkeim wurde isoliert und gleichzeitig mit einer *Sarcina lutea* (aus der Sammlung des Hygienischen Institutes) hinsichtlich seiner Ammoniakproduktion geprüft (s. Tab. 17).

Tabelle 17.

Eine 0,120proz. Lösung von Pepton Chapoteaut I (enthaltend 3,74 mg NH_2-N in 100 ccm) wurde mit je $10 \cdot 10^6$ Keimen pro Kubikzentimeter beimpft und im Sauerstoffstrom bei 37° bebrütet.

Stamm	Dauer der Bebrütung Std.	Keimzahl pro ccm	mg NH_2-N in 100 ccm	= % des Ausgangs-NH_2-N
Sarcina aus der Luft	72	$408 \cdot 10^6$	1,55 1,56 } 1,56	41,6
	120	$450 \cdot 10^6$	3,23 3,22 } 3,23	86,2
Sarcina lutea (Institutsstamm)	48	$820 \cdot 10^6$	1,72 1,77 } 1,75	46,7
	72	$820 \cdot 10^6$	3,70 3,72 } 3,71	99,0
	120	$800 \cdot 10^6$	3,66 3,63 } 3,65	97,4

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß auch *Sarcina lutea* als Quelle der Ammoniakbildung lediglich die vorhandenen freien Aminogruppen des Peptons zu benutzen vermag und offenbar — im Gegensatz zu *B. subtilis* — nicht fähig ist, die Peptidbindungen im Pepton anzugreifen. Ob dieses biochemisch gleichartige Verhalten von *Staphylococcus aureus* und *Sarcina lutea* eine innere Beziehung zu ihrer benachbarten Stellung in der bakteriologischen Systematik aufzeigt, müssen weitere Untersuchungen in der Reihe der Kokken ergeben.

V. Die Beziehung zwischen Ammoniakproduktion und Keimzahl.

Bei der Untersuchung der Keimvermehrung und der Stoffwechselleistungen des *Vibrio cholerae* auf Aminosäuren konnte *J. Hirsch*[1] feststellen, daß die Abspaltung des Amino-Stickstoffs hauptsächlich während einer Zeit stattfindet, in welcher die initiale Vermehrung der Keime bereits abgeschlossen war. In gleicher Weise wurde der zeitliche Zusammenhang zwischen Keimvermehrung und Ammoniakproduktion des *Staphylococcus aureus* auf Peptonwasser überprüft. Darüber hinaus wurde versucht, die quantitativen Beziehungen der dargebotenen Menge freier Aminogruppen zur Keimproduktion zu ermitteln. Für derartige

[1] *J. Hirsch*, l. c. (1).

Untersuchungen schien es angebracht, die Umsetzungen in *verdünnten* Peptonlösungen vorzunehmen, in denen auf jeden Fall ein Überschuß von energetisch ausnutzbarem Nährsubstrat vermieden wurde.

Als Nährlösung diente eine mit Phosphat gepufferte Nährlösung von 0,05% und 0,1% Pepton Chapoteaut I mit 1,56 mg bzw. 3,12 mg NH_2-N in 100 ccm. Beide Medien wurden mit $5{,}10^6$ Keimen pro Kubikzentimeter beimpft und mit reinem Sauerstoff belüftet. Die Ergebnisse der nephelometrischen Keimzählung und der Ammoniakbestimmung sind in der nachfolgenden Tab. 18 zusammengestellt.

Tabelle 18.

Peptongehalt %	Dauer der Bebrütung Std.	Amoniak-N in 100 ccm mg	= % des Ausgangs Amino-N %		Keimzahl pro ccm	Amoniak-N, produziert von $100 \cdot 10^6$ Keimen γ
0,05	12	nicht bestimmbar			$129 \cdot 10^6$	—
0,1		nicht bestimmbar			$295 \cdot 10^6$	—
0,05	24	1,205	77,2	77,2	$138 \cdot 10^6$	8,69
		1,203	77,1			
0,1		2,601	83,4	84,4	$305 \cdot 10^6$	8,63
		2,662	85,3			
0,05	48	1,466	94,0	94,0	$131 \cdot 10^6$	11,19
		1,466	94,0			
0,1		2,848	91,3	91,9	$251 \cdot 10^6$	11,42
		2,886	92,5			
0,05	72	1,558	99,9	100,3	$130 \cdot 10^6$	12,02
		1,569	100,6			
0,1		2,986	95,5	96,1	$243 \cdot 10^6$	12,33
		3,015	96,6			
0,05	120	1,569	100,6	101,2	$130 \cdot 10^6$	12,13
		1,586	101,7			
0,1		3,137	100,5	100,1	$238 \cdot 10^6$	12,68
		3,110	99,7			

Nach den ersten 12 Stunden ist — unabhängig von der Konzentration der Nährlösung — die Vermehrung der Keime praktisch abgeschlossen, während das in dieser Zeit abgespaltene Ammoniak zwar qualitativ nachweisbar ist, jedoch noch keine quantitativ meßbaren Mengen erreicht hat. Die analytisch erfaßbare Desaminierung beginnt erst nach der 12. Stunde und erreicht in beiden Konzentrationen bis zur 24. Stunde nach der Einsaat etwa 80% des theoretisch möglichen Umfangs. In den darauf folgenden Tagen schreitet die Ammoniakproduktion wesentlich verlangsamt bis zu dem maximal möglichen Wert von 100% des

eingebrachten Amino-Stickstoffs fort. Als wesentlich muß hervorgehoben werden, daß in den stark verdünnten Peptonlösungen die Keimzahl durch die Menge des dargebotenen Peptons bedingt wird; sie ist — wie wir später noch nachweisen werden — bei den angewandten Konzentrationen lediglich von den *energetisch* ausnutzbaren Anteilen des Peptons abhängig. Die Keimzahlen sowie die Mengen des produzierten Ammoniaks verhalten sich in den 0,05proz. und 1proz. Peptonlösungen — entsprechend diesen Konzentrationen — praktisch stets wie 1 : 2. Demzufolge ist die von 100 Millionen Keimen abgespaltene Menge Ammoniak in beiden Lösungen zu jedem Zeitpunkt gleich groß.

Trotzdem kann aus dem vorliegenden Zahlenmaterial kein Anhaltspunkt für die Relation zwischen der Erzeugung einer bestimmten Bakterienmenge und dem damit verknüpften Umfang der Desaminierung gewonnen werden. Denn die nephelometrische Keimzählung erfaßt lediglich die vorhandenen Bakterien und läßt keinen Schluß zu, ob die Population praktisch erhalten bleibt oder etwa durch gleichmäßiges Zuwachsen und Absterben fortlaufend regeneriert wird.

Die enge *quantitative* Verknüpfung zwischen Keimzahl und Ammoniakbildung liefert einen weiteren Beweis dafür, daß die energetische Ausnutzung des Peptons durch *Staphylococcus aureus* sich in erster Linie durch Desaminierung vollzieht.

VI. Die verschiedenen physiologischen Funktionen des Peptons als Nährsubstrat für Staphylococcus aureus.

a) *Die Differenzierung der energetischen und stofflichen Ausnutzung des Peptons.*

In den vorhergehenden Abschnitten konnte gezeigt werden, daß Staphylokokkenkulturen, denen als einzige stickstoff- und kohlenstoffhaltige Verbindung Pepton dargeboten wird, als eine wesentliche Umwandlung eine oxydative Desaminierung der vorhandenen freien Aminogruppen bewirken, und daß das hierdurch gebildete Ammoniak in einer quantitativen Beziehung zur Keimvermehrung steht. In den früheren Untersuchungen von *J. Hirsch*[1] über die Vermehrung von Choleravibrionen auf reinen Asparaginsäurelösungen konnte nachgewiesen werden, daß der Vorgang der Desaminierung lediglich der Dissimilation im eigentlichen Sinne, d. h. energetischen Zwecken dient, während die Assimilation an dem stickstoffhaltigen Asparaginsäuremolekül bzw. an einem nichtdesaminierten Bruchstück ansetzt. Von dieser Erfahrung ausgehend, haben wir uns bemüht, die Bedeutung des Peptons als Nährsubstrat für Staphylokokken hinsichtlich seiner stofflichen und energetischen Verwendung festzustellen, d. h. seine verschiedenen physiologischen Funktionen zu differenzieren.

[1] *J. Hirsch*, l. c. (1).

In einem schon oben (s. S. 456) angeführten orientierenden Versuch ist gezeigt worden, daß bei Zusatz von Traubenzucker zu Peptonlösung eine Vermehrung der Staphylokokken stattfindet, ohne daß — selbst unter aeroben Verhältnissen — eine Ammoniakabspaltung eintritt, und daß weiterhin bei Zusatz von Traubenzucker Staphylokokken unter streng anaeroben Bedingungen gezüchtet werden können. Dieser Befund weist darauf hin, daß Glykose als eine vollwertige, ja sogar als eine bevorzugte Energiequelle für Staphylokokken gelten kann. Wir können demnach die energetische Funktion des Peptons durch einen Zusatz von Glykose ausschalten und die stoffliche Bedeutung des Peptons — und zwar in erster Linie als Stickstoffquelle — in Erscheinung treten lassen.

Der nachfolgende Versuch zeigt das Verhalten von Staphylokokken auf Peptonlösungen, deren Konzentrationen für den Energiebedarf unzureichend sind. Zum Vergleich ist der Effekt des Glykosezusatzes sowie weiterhin eine Versuchsreihe mit höherer Peptonkonzentration dargestellt.

Tabelle 19.

Pepton Chapoteaut I %	Glykose %	Keimdichte (geschätzt) nach 24 Std.	48 Std.	72 Std.	Ammoniak nach 72 Std. (*Nessler*)
0,025	—	(+)	(+)	(+)	+
0,025	0,5	(+)	+	+++	—
0,2	—	(+)	++	+++	++
0,2	0,5	+	++	+++	—

25 mg Pepton in 100 ccm genügen nicht, um den für eine lebhafte Vermehrung einer Staphylokokkenkultur erforderlichen Energiebedarf zu decken. Andererseits sind die bei dieser Konzentration vorhandenen assimilierbaren Anteile des Peptons für die *stofflichen* Erfordernisse eines erheblichen Keimzuwachses ausreichend; denn ein Zusatz von Brennstoff in Form von Glykose führt zu einer Keimvermehrung, die nur wenig der Vermehrung auf einer 8fach stärkeren Peptonlösung nachsteht. Nochmals erwähnt sei, daß bei Gegenwart von Traubenzucker keine Desaminierung nachzuweisen ist, daß somit „Eiweiß" eingespart wird.

Eine weitere Differenzierung der energetischen und stofflichen Ausnutzung von Peptonen durch Staphylokokken ergab sich aus einer umfassenden Versuchsreihe, in welcher die Keimvermehrung nach 20 Stunden auf verschiedenen Peptonkonzentrationen (3—0,25%) ohne und mit Zusatz von Glykose ermittelt wurde. Zu diesem Versuch wurden mehrere Peptonsorten herangezogen. Die Nährlösungen wurden in Erlenmeyer-Kolben in 7—8 mm Schichthöhe mit $15 \cdot 10^6$ Keimen pro Kubikzentimeter beimpft. Eine besondere Belüftung fand nicht statt.

Die Ergebnisse der Keimzählungen sind auf der Abb. 1 dargestellt. Die schraffierten Säulenabschnitte geben die Zahlen für die zuckerfreien Peptonlösungen an, die ganzen Säulen die Keimzahlen der zuckerhaltigen Medien. Jede graphisch dargestellte Keimzahl entspricht dem Mittelwert zweier Parallelansätze.

Zur Diskussion der Ergebnisse müssen Erfahrungen herangezogen werden, über die in einer vorläufigen Mitteilung bereits kurz berichtet worden ist[1]. Danach ist die Keimvermehrung unter den in der vorliegenden Versuchsreihe angewandten üblichen Züchtungsbedingungen weitgehend von der Geschwindigkeit der Sauerstoffdiffusion bzw. von

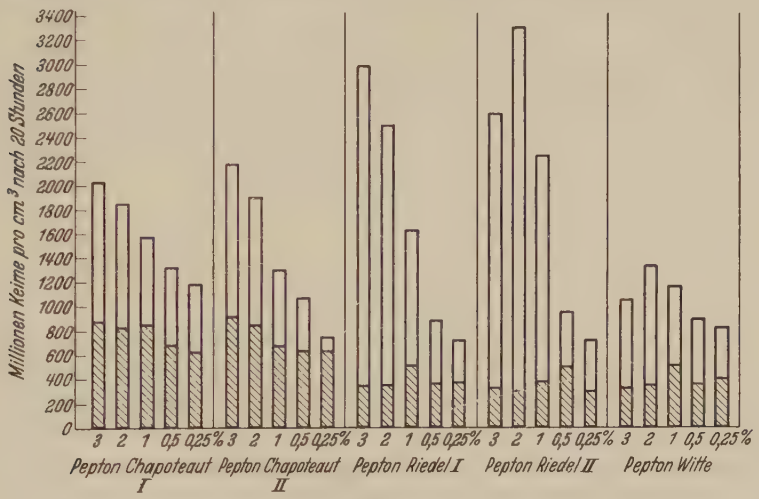

Abb. 1.

der Schichthöhe der Kulturflüssigkeit abhängig. In *reinen* Peptonlösungen, deren energetische Ausnutzung an die Gegenwart ausreichender Sauerstoffmengen geknüpft ist, kann bei einer Schichthöhe von 7—8 mm eine vollkommene Verwertung des Nährsubstrates nicht erwartet werden.

Dementsprechend zeigen die Keimzahlen der zuckerfreien Peptonlösungen — die schraffierten Säulen der Abb. 1 — für die Peptone Chapoteaut I und II nur eine geringe, für die anderen Peptonsorten überhaupt keine Abhängigkeit von der Konzentration des angewandten Nährstoffes. In den erreichten nicht gestuften Keimzahlen prägt sich lediglich die infolge der Schichthöhe unzureichende Sauerstoffversorgung aus, die eine maximale energetische Ausnutzung auf dem Wege der oxydativen Desaminierung nicht zuläßt.

---

[1] *J. Hirsch* und *A. W. Müller*, Klin. Wschr. **12**, 231 (1933).

Ein wesentlich anderes Bild bieten die Keimzahlen der Versuchsreihen mit einem Glykosezusatz von 0,5%. Hier sehen wir eine deutliche Abstufung der erreichten Keimzahlen, die (mit Ausnahme von 2 Werten, auf welche noch zurückzukommen ist, s. S. 481) den dargebotenen Peptonkonzentrationen durchaus parallel läuft.

Wir haben wiederholt darauf hingewiesen, daß Glykose im Vergleich zum Pepton eine bevorzugte Energiequelle darstellt. Ferner liegen zahlreiche Beobachtungen[1] darüber vor, daß die energetische Ausnutzung der Glykose bei der Keimvermehrung weitgehend auf dem anoxybiontischen Wege der Glykolyse erfolgen kann. Beim Zusatz von Glykose wird somit der *Energiewechsel* bei der Vermehrung der Staphylokokken unabhängig von der Sauerstoffzufuhr und von dem Pepton. Die Abstufung der Keimzahlen bei verschiedenen Peptonkonzentrationen und bei gleichen Mengen energieliefernder Glykose kann deshalb nur ein Ausdruck für die abgestuften Mengen der *stofflich* verwertbaren Anteile des Peptons sein. Die angeführte Versuchsreihe liefert also einen weiteren Beitrag zur Differenzierung der energetischen und stofflichen Ausnutzung des Peptons.

b) Die Ersetzbarkeit der energetischen Funktion des Peptons durch chemisch definierte Substanzen.

Die (S. 466) beobachtete Hemmung der Keimvermehrung auf verdünnten Peptonlösungen beruht lediglich auf einem Mangel an energielieferndem Substrat. Da — wie wir gezeigt haben — der *Staphylococcus aureus* auf reinen Peptonlösungen seinen Energiebedarf vornehmlich durch oxydative Desaminierung deckt, lag der Versuch nahe, durch Zufügen von freien Aminogruppen in Form von einfachen α-Aminosäuren (analog dem Zusatz von Glykose) eine zusätzliche Energiequelle zu liefern.

Als *assimilierbares* Substrat diente wiederum eine 0,025proz. Peptonlösung, deren Amino-Stickstoff 0,78 mg in 100 ccm betrug. Hierzu wurden verschiedene α-Aminosäuren in einer Konzentration von mol/40 hinzugefügt. Als quantitativer Beweis für ihre energetische Ausnutzung diente die Menge des abgespaltenen Ammoniak-Stickstoffs, die mehr als 100% des im Pepton dargebotenen Amino-Stickstoffs betragen mußte.

Aus der Tab. 20 ist ersichtlich, daß Staphylokokken die Aminogruppen ein- und zweibasischer α-Aminosäuren abzuspalten vermögen. Der Befund, daß mehr als 100% der im Pepton vorhandenen Aminogruppen als Ammoniak erscheinen, läßt naturgemäß keinen Schluß zu auf die Beteiligung des Peptons einerseits und der Aminosäuren andererseits an der Gesamtmenge des gebildeten Ammoniaks. Auf jeden Fall

[1] So z. B. auch bei *J. Hirsch*, l. c. (1); *J. Hirsch* und *A. W. Müller*, l. c.

Tabelle 20.

Pepton Chapoteaut I %	Aminosäure m/40	Ammoniak-N in 100 ccm mg	= % des im Pepton vorhandenen NH_2-N %
0,025	—	0,51	65,4
0,025	Glykokoll	1,43	183,3
0,025	Alanin	1,05	134,6
0,025	Phenylalanin	0,86	110,2
0,025	Leucin	0,86	110,2
0,025	Asparaginsäure	1,40	179,4
0,025	Glutaminsäure	1,19	152,7

scheint es für die energetische Versorgung von Staphylokokken lediglich auf die freien Aminogruppen anzukommen, denn die energetische Funktion des Peptons ist durch Aminosäuren ersetzbar.

Die Desaminierung der Aminosäuren erfolgt gleichfalls nur in Gegenwart von Luftsauerstoff (s. Tab. 21).

Tabelle 21.

Pepton Chapoteaut I %	Asparagin-säure	Glykose %	Nach 24 Stunden			
			aerob		anaerob	
			Keim-vermehrung	NH_3	Keim-vermehrung	NH_3
0,025	—	—	(+)	+	—	—
0,025	mol/40	—	+	+	—	—
0,025	mol/40	0,5	++	—	+	—

Unter streng anaeroben Bedingungen — in der S. 456 angeführten Versuchsanordnung — vermag *Staphylococcus aureus* Asparaginsäure ebensowenig zu desaminieren wie das Pepton. Die energetische Ausnutzung der Aminosäure wird durch Glykose gleichfalls im Sinne einer „Eiweißeinsparung" unter aeroben Bedingungen verhindert.

An die oxydative Desaminierung der Asparaginsäure durch den *Vibrio cholerae* schließt sich ein Abbau bzw. eine partielle Verbrennung des stickstofffreien Restes an; und so könnte man erwarten, daß auch die Reste des von den Staphylokokken desaminierten Peptons einer weiteren energetischen Ausnutzung unterliegen. Diese Frage ist analytisch außerordentlich schwer zu beantworten. Für den Fall der Aminosäuren besteht jedoch die Möglichkeit, an den entsprechenden Fettsäuren die Frage nach ihrer energetischen Verwertbarkeit zu prüfen. Wir haben deshalb zu Peptonlösungen geringer Konzentration Fettsäuren in Form ihrer Natriumsalze hinzugefügt und durch Ammoniakbestimmungen festzustellen versucht, ob diese Zusätze — ebenso wie die Glykose — die Desaminierung des Peptons verhindern (s. Tab. 22).

Tabelle 22.

Pepton Chapoteaut I %	Zusätzliche Energiequelle mol/40	Ammoniak-N in 100 ccm mg	= % des im Pepton vorhandenen NH_2-N %
0,025	—	0,73	93,6
0,025	Na-acetat	0,76	97,5
0,025	Na-succinat	0,51	65,4
0,025	Glykose	—	—

Die Anwesenheit von Essigsäure oder Bernsteinsäure (die einem desaminierten Glykokoll bzw. einer desaminierten Asparaginsäure entsprechen), vermag nicht die Desaminierung der geringen vorhandenen Peptonmengen zu unterdrücken. Inwieweit diese Fettsäuren von Staphylokokken überhaupt angegriffen werden, ist aus der vorliegenden Versuchsanordnung nicht ersichtlich. Auf keinen Fall hat ihre energetische Ausnutzung einen so wesentlichen Wert wie die bevorzugte Verwendung der Glykose, da eine „Eiweißeinsparung" nicht festzustellen ist. Für die Rolle der Aminosäuren im Energieumsatz der Staphylokokken ergibt sich aus diesem Versuche die primäre Bedeutung ihrer Aminogruppen und damit wiederum die allgemeine und prinzipielle Bedeutung der oxydativen Desaminierung für die energetische Ausnutzung von Eiweißabbauprodukten durch Staphylokokken.

Die oxydative Desaminierung des Peptons durch aerobe Erreger dürfte dem gleichen Chemismus folgen, wie die der α-Aminosäuren. Für diese Umsetzung hatten bekanntlich *Neubauer* und *Fromherz*[1] bereits im Jahre 1911 die intermediäre Entstehung von α-Ketonsäuren angenommen. Tatsächlich gelang es kürzlich *H. A. Krebs*[2] bei der Desaminierung von α-Aminosäuren durch tierische Gewebszellen diese erste Abbaustufe zu isolieren. Gleichzeitig konnte *Krebs* zeigen, daß die oxydative Desaminierung der *einzige* Weg ist, durch den im Tierkörper die Desaminierung der Aminosäuren erfolgt. Für die Bakterien kommen sicherlich auch andere Wege der Desaminierung in Frage. So konnte z. B. *Hirsch*[3] die reduktive Desaminierung der Asparaginsäure zu Bernsteinsäure unter anaeroben Bedingungen quantitativ aufzeigen. Weiterhin gelang es *A. I. Virtanen* und *J. Tarnanen*[4] aus dem *Bacterium fluorescens* ein Enzym (Aspartase) zu gewinnen, das die Spaltung und Synthese von l-Asparaginsäure nach der Gleichung: $COOH \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH \rightleftharpoons COOH \cdot CH{:}CH \cdot COOH + NH_3$ bewirkt. Bezüglich anderer bakterieller Umwandlungen sei auf die zusammenfassende Arbeit von *A. Janke*[5] hingewiesen. Für die *energetische* Ausnutzung der Aminosäuren durch Desaminierung dürfte für die Bakterien lediglich der *oxydative* Abbau in Frage kommen.

[1] *Neubauer* und *Fromherz*, Hoppe-Seylers Z. **70**, 348 (1911).
[2] *H. A. Krebs*, Klin. Wschr. **11**, 1744 (1932).
[3] *J. Hirsch*, l. c. (2), S. 396.
[4] *A. I. Virtanen* und *J. Tarnanen*, Biochem. Z. **250**, 193 (1932).
[5] *A. Janke*, l. c.

c) *Die Ersetzbarkeit der stofflichen (assimilatorischen) Funktion des Peptons durch chemisch definierte Substanzen.*

Zur Frage der Verwertung chemisch definierter stickstoffhaltiger Substanzen zum Aufbau der Staphylokokkenleiber hatten wir bereits (s. S. 448) auf die negativen Ergebnisse anderer Autoren hingewiesen. Unsere eigenen Versuche erstreckten sich auf die Prüfung von Nährlösungen, die neben Mineralsalzen verschiedene α-Aminosäuren (Glykokoll, Alanin, Phenylalanin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Cystin, Tryptophan) als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle enthielten. Auf keinem dieser Medien gingen Staphylokokken an, auch nicht bei Zusatz von Glykose. Versuche mit Kreatin als einziger Stickstoff- und Kohlenstoffquelle, die wir auf Grund der positiven Ergebnisse von *A. Lübbert*[1] durchführten, verliefen (mit einem reinen Kahlbaum-Präparat) ergebnislos. Der gegenteilige Befund *Lübberts* dürfte auf die Verwendung eines ungenügend gereinigten Präparates zurückzuführen sein. Obwohl der *Staphylococcus* einfache Aminosäuren *energetisch* auszunutzen vermag, ist er hinsichtlich seines *stofflichen* (Stickstoff-) Bedarfes auf höher molekulare Eiweißabbauprodukte angewiesen. Ob die Stufe der Polypeptide bereits den Ansprüchen des Erregers genügt, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

d) *Die im Pepton enthaltenen Reizstoffe für die initiale Keimvermehrung.*

In den letzten Jahren haben sich zahlreiche Autoren zur Untersuchung von Stoffwechselleistungen der Bakterien der gasvolumetrischen Mikromethode von *Barcroft-Warburg* bedient. Diese Arbeiten (*Warburg, Meyerhof, Quastel* u. a.) betrafen in erster Linie den Gasstoffwechsel und bestimmte fermentative Umsetzungen der Mikroorganismen. Zur Untersuchung gelangten zumeist dichte Bakteriensuspensionen in Lösungen, die zur Ermittlung einer definierten Einzelfunktion geeignet waren. Da die Ergebnisse auf eine gegebene Bakterienzahl oder auf Trockengewichtseinheiten der Keime bezogen wurden, mußte eine Vermehrung ausgeschaltet werden. Dies wurde dadurch erreicht, daß die Erreger vorher durch gründliches Auswaschen von anhaftenden Nährstoffen befreit wurden, und dadurch, daß ihnen ein zur Vermehrung unzureichendes einfaches Substrat dargeboten wurde. In Verfolg von Untersuchungen über die Physiologie der Keimvermehrung[2] konnte gezeigt werden, daß die gasvolumetrische Messung des Sauerstoffverbrauches zur Ermittlung des fortschreitenden Bakterienzuwachses geeignet ist. Der Anstieg des Sauerstoffverbrauches in der Zeiteinheit gibt ein anschauliches Bild von der Zunahme der lebenden Substanz.

[1] *A. Lübbert*, l. c.

[2] *J. Hirsch*, Zbl. Bakter. I Orig **127**, H. 1—3 (Beih.), 116 (1932), [3]; Klin. Wschr. **12**, 191 (1933), [4]; *J. Hirsch* und *A. W. Müller*, l. c.

Ein besonderer Vorteil der Methode besteht darin, daß sie gestattet, die Vermehrung einer Kultur schon in ihren ersten Anfängen zur Darstellung zu bringen, wo die — sonst exakte — objektive Nephelometrie der Keimdichte versagt, und die direkte Keimzählung sowie das Plattenverfahren wegen ihrer bekannten Ungenauigkeit an und für sich wenig brauchbar sind. Wir haben die gasvolumetrische Methode zur Beurteilung der Peptonverwertung durch Staphylokokken herangezogen, indem wir den Sauerstoffverbrauch bei der Vermehrung in Peptonwasser mit und ohne Glykosezusatz ermittelt haben.

In den *Warburg*-Gefäßen wird erfahrungsgemäß durch die Bewegung dünner Flüssigkeitsschichten eine ausgezeichnete Belüftung gewährleistet. Es erschien deshalb angezeigt, den Einfluß verschiedener Peptonkonzentrationen auf die Vermehrung von Staphylokokken nochmals zu überprüfen, nachdem (s. S. 467) unter den üblichen Kulturbedingungen die maximale Umsetzung des dargebotenen Peptons an der unzureichenden Sauerstoffversorgung gescheitert war.

Zur Messung wurden flache runde Warburg-Gefäße mit einem zentral gelegenen CO_2-Absorptionstrog (zur Aufnahme von NaOH) verwendet. Der Gesamtdurchmesser der Gefäße betrug etwa 55—60 mm, ihr Rauminhalt zwischen 30 und 35 ccm. Zur Untersuchung gelangten stets 3 ccm beimpfter Nährflüssigkeit, deren Schichthöhe sich auf etwa 1,2 mm errechnete. Vergleichende Messungen hatten ergeben, daß bei diesen Verhältnissen eine für die maximale Keimvermehrung ausreichende Belüftung gewährleistet wird.

In der Tab. 23 ist der halbstündliche Sauerstoffverbrauch bei der Keimvermehrung von *Staphylococcus aureus* in Peptonlösungen verschiedener Konzentration angeführt. Die Einsaat betrug $30 \cdot 16^6$ Keime pro Kubikzentimeter, die Wasserbadtemperatur 37°.

Tabelle 23.

Nach	Peptonwasser Chapoteaut II		
	0,5%	1%	2%
	halbstündlicher Sauerstoffverbrauch pro ccm Kultur cmm O_2 bei 0° und 760 mm Hg		
	cmm	cmm	cmm
$^1/_2$ Stunde	1,3	3,5	4,9
1 „	2,2	2,2	2,9
$1^1/_2$ Stunden	3,1	3,5	3,7
2 „	0,9	1,8	5,8
$2^1/_2$ „	5,3	6,6	10,7
3 „	5,3	10,1	18,5
$3^1/_2$ „	8,8	17,6	32,1
4 „	9,3	22,9	40,3
Gesamt-O_2-Verbrauch nach 10 Stunden	140,4 cmm	334,0 cmm	641,4 cmm
Keimzahl pro Kubikzentimeter nach 10 Stunden		$2{,}68 \cdot 10^9$	$4{,}98 \cdot 10^9$

Unmittelbar nach dem Ausgleich des Gasdruckes tritt häufig in der sog. latenten Phase der Vermehrung ein relativ erhöhter Sauerstoffverbrauch auf, der bald wieder absinkt; er dürfte auf der Umsetzung autoxydabler Bestandteile des Peptons beruhen. Die manifeste Zunahme des Sauerstoffverbrauches, d. h. der feststellbare Zuwachs an lebender Substanz beginnt zumeist um die zweite Stunde nach der Einsaat.

Aus der Tab. 23 geht hervor, daß — unter den Bedingungen optimaler Belüftung — die in 10 Stunden verbrauchten Sauerstoffmengen und die in dieser Zeit erreichten Keimzahlen eine entsprechende quantitative Abstufung aufweisen, wie die angewandten Konzentrationen des Peptons; in dieser Abstufung prägen sich eben die verschiedenen Mengen der energetisch und stofflich verfügbaren Bestandteile des Peptons aus.

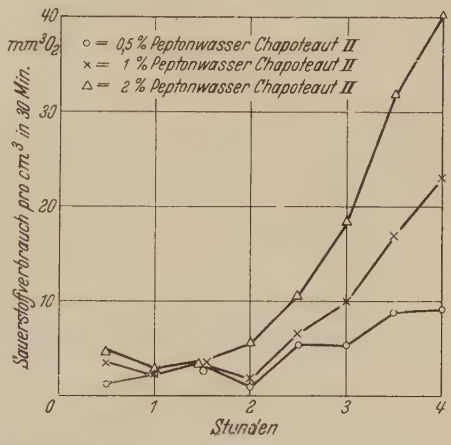

Abb. 2.

Hingegen ist es in hohem Maße überraschend, daß sich die Verschiedenheit der Konzentration der Peptonlösungen bereits *von vornherein* in der Intensität der Vermehrung bzw. in der Steilheit der Sauerstoffkurven (s. Abb. 2) ausprägt. Ein erheblicher Verbrauch der 0,5proz. oder gar der 1proz. und 2proz. Peptonlösungen ist in den ersten 4 Stunden nach der Beimpfung kaum möglich, d. h. die Unterschiede in der initialen Vermehrungsintensität können nicht auf einer zeitlich verschiedenen Erschöpfung von energetisch oder stofflich ausnutzbaren Substanzen beruhen.

Daß ein Unterschied in der Menge des vorhandenen *Brennstoffs* an und für sich keinen Einfluß auf die initiale Vermehrung ausübt, geht aus einer Versuchsreihe hervor, in der die energetische Funktion einer Peptonlösung durch einen abgestuften Zusatz von Glykose (als bevorzugter Brennstoff) ersetzt wurde. Zu einer 2proz. Lösung von Pepton Chapoteaut II wurden 0,18%, 0,36% und 0,72% Glykose hinzugefügt. Die Nährlösungen wurden mit $32 \cdot 10^6$ Keimen pro Kubikzentimeter beimpft und bei 37° bebrütet (s. Tab. 24).

Innerhalb der ersten 6 Stunden verlaufen die Kurven (s. Abb. 3) des zunehmenden halbstündlichen Sauerstoffverbrauchs — unabhängig von der Abstufung der energieliefernden Glykose — praktisch vollkommen gleich[1].

[1] Die verschiedenen Konzentrationen der Glykose prägen sich erst später in dem Kurvenverlauf aus, und zwar jeweils zu einem Zeitpunkt, an dem der Gesamt-

Tabelle 24.

Nach	2 proz. Peptonwasser Chapoteaut II		
	0,18% Glykose	0,36% Glykose	0,72% Glykose
	halbstündlicher Sauerstoffverbrauch pro ccm Kultur cmm O_2 bei 0° und 760 mm Hg		
	cmm	cmm	cmm
$^1/_2$ Stunde	4,5	4,8	5,7
1 „	4,5	4,4	4,9
$1^1/_2$ Stunden	5,4	4,8	4,9
2 „	8,6	7,9	8,8
$2^1/_2$ „	18,1	17,2	19,4
3 „	30,4	33,0	36,1
$3^1/_2$ „	48,5	47,4	53,0
4 „	58,5	58,7	62,0
$4^1/_2$ „	66,8	69,9	71,2
5 „	68,2	68,9	73,6
$5^1/_2$ „	79,3	76,1	80,6
6 „	80,0	78,7	81,9
Gesamt-O_2-Verbrauch nach 66 Stunden	472,8 cmm	481,8 cmm	502,6 cmm

Für die Differenzierung der initialen Vermehrungsintensität in den drei Peptonkonzentrationen (s. Tab. 23; Abb. 2) müssen also andere

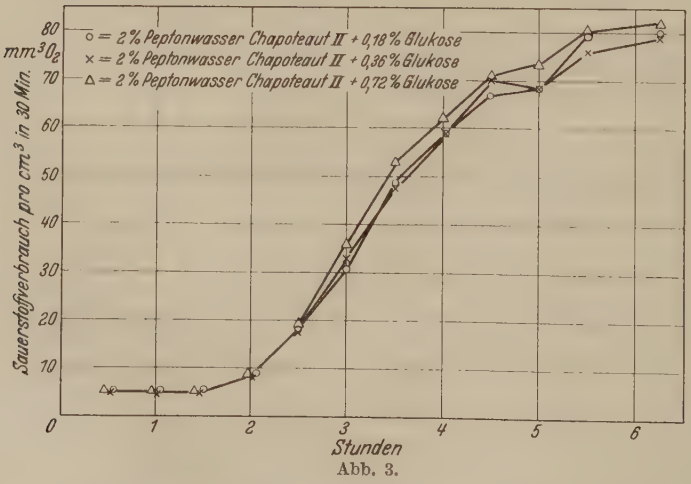

Abb. 3.

Faktoren als die Abstufung der Brennstoffe verantwortlich gemacht werden, und zwar solche, die die Geschwindigkeit der Keimvermehrung

sauerstoffverbrauch ein Drittel desjenigen Wertes erreicht hat, der zur vollständigen Verbrennung des zugesetzten Zuckers theoretisch erforderlich ist. Diese Zusammenhänge sind bereits kurz mitgeteilt worden (*Hirsch* und *Müller*, l. c.).

beeinflussen. In der Literatur der letzten Jahre sind eine große Reihe von Substanzen (bzw. Substanzwirkungen) beschrieben worden, welche als Wuchsstoffe, Vitamine, Wachstumsfaktoren usw. bezeichnet worden sind. Es ist hierbei oft nicht mit genügender Schärfe definiert, ob es sich um Stoffe handelt, die für das Wachstum von Zellen und Zellverbänden unerläßlich sind, oder um Substanzen, welche lediglich das Wachstum bzw. die Vermehrung beschleunigen. Das — bei der Vermehrung von Staphylokokken auf Pepton — oben beschriebene Phänomen dürfte von Stoffen der letztgenannten Art hervorgerufen werden. Es sei ausdrücklich vermerkt, daß es sich hier um Reizwirkungen handelt, die offensichtlich von der Konzentration der vorhandenen Reizstoffe abhängen.

Aus den folgenden Versuchsreihen geht hervor, daß die drei Peptonpräparate — Chapoteaut, Riedel und Witte — sich in ihrem Gehalt an Reizstoffen für die initiale Vermehrung wesentlich unterscheiden. Zur Untersuchung gelangten 2proz. Peptonwasser-Kulturen, ohne und mit Zusatz von 0,18% Glykose, die mit $15 \cdot 10^6$ Keimen pro Kubikzentimeter beimpft und bei 37° beobachtet wurden.

Die Gesamtmenge des nach $4^1/_2$ Stunden verbrauchten Sauerstoffs und die erreichten Keimzahlen betragen bei Pepton Chapoteaut ein Vielfaches der Werte von Pepton Riedel und Pepton Witte. Dieses gilt sowohl für die Versuchsreihe ohne Glykosezusatz wie für die mit Glykosezusatz. Die annähernde Übereinstimmung des Gesamtsauerstoffverbrauches (nach $4^1/_2$ Stunden) bei den gleichen Peptonsorten in beiden Versuchsreihen soll in Anbetracht des verschiedenen energe-

Tabelle 25.

Nach	2proz. Lösung von Pepton		
	Chapoteaut II	Riedel II	Witte II
	halbstündlicher Sauerstoffverbrauch pro ccm Kultur cmm O_2 bei 0° und 760 mm Hg		
	cmm	cmm	cmm
$^1/_2$ Stunde	4,4	6,6	2,2
1 „	1,3	0,8	—
$1^1/_2$ Stunden	2,2	1,2	1,1
2 „	6,6	2,5	2,6
$2^1/_2$ „	13,2	4,5	4,0
3 „	25,2	8,6	6,6
$3^1/_2$ „	46,8	10,7	10,5
4 „	58,1	12,8	11,2
$4^1/_2$ „	53,0	14,0	9,2
Gesamt-O_2-Verbrauch nach $4^1/_2$ Stunden	210,8 cmm	61,7 cmm	47,4 cmm
Keimzahl pro Kubikzentimeter nach $4^1/_2$ Stunden	$1{,}99 \cdot 10^9$	$< 0{,}03 \cdot 10^9$	$< 0{,}03 \cdot 10^9$

Tabelle 25 (Fortsetzung).

Nach	Mit Zusatz von 0,18% Glykose halbstündlicher Sauerstoffverbrauch pro ccm Kultur		
	cmm	cmm	cmm
$^1/_2$ Stunde	—	3,3	4,0
1 „	2,2	2,1	1,3
$1^1/_2$ Stunden	3,1	0,8	1,8
2 „	3,5	2,5	3,1
$2^1/_2$ „	9,7	3,3	5,3
3 „	21,2	4,5	7,9
$3^1/_2$ „	45,9	11,1	14,5
4 „	70,7	16,5	15,1
$4^1/_2$ „	77,3	23,1	20,7
Gesamt-O_2-Verbrauch nach $4^1/_2$ Stunden	233,6 cmm	67,2 cmm	73,7 cmm
Keimzahl pro Kubikzentimeter nach $4^1/_2$ Stunden	$2{,}98 \cdot 10^6$	$0{,}71 \cdot 10^6$	$0{,}91 \cdot 10^6$

tischen Effektes — der oxydativen Desaminierung in dem einen Falle und der Glykoseverbrennung im anderen Falle — nicht weiter ausgewertet werden. Hervorzuheben ist, daß bei Zusatz von Glykose durchweg höhere Keimzahlen erreicht werden, was den Erfahrungen über die bevorzugte Verwendung von Zucker als Energiequelle bei der Keimvermehrung durchaus entspricht.

Die Unterschiede in den erreichten Keimzahlen, die sich in den zuckerfreien Lösungen zwischen Pepton Chapoteaut und den beiden anderen Peptonen zeigen, treten nach Zusatz von Glykose im gleichen Sinne in Erscheinung. Auf diese Tatsache muß besonders hingewiesen werden, denn sie beweist, daß diese Unterschiede *unabhängig von dargebotenem Brennstoff* sind. Während in der zuckerfreien Lösung die verschiedene Keimvermehrung allenfalls ein Ausdruck für die verschiedene energetische Verwertbarkeit der drei Peptone sein könnte, wird dieses Argument durch die zweite Versuchsreihe widerlegt. Hier steht den Staphylokokken in der Glykose ein und derselbe bevorzugte Brennstoff zur Verfügung.

Die Möglichkeit, daß etwa die stofflich (assimilatorisch) verwertbaren Anteile der Peptone den Unterschied der Bakterienernten bedingen, wird dadurch ausgeschlossen, daß die Abstufung in der Zunahme des Sauerstoffverbrauches, d. h. im Zuwachs der lebenden Substanz sich *von vornherein* ausprägt, wie besonders deutlich aus der graphischen Darstellung der Zahlenwerte (s. Abb. 4) hervorgeht[1]. Ebenso wie in dem vorhergehenden Versuch (s. Tab. 24; Abb. 3) läßt sich eine verschiedene Vermehrungsintensität bereits zu einer Zeit fest-

[1] Diese Beweisführung gilt natürlich auch gegen eine Abhängigkeit des beobachteten Phänomens von der Menge des energetisch verfügbaren Materials.

stellen, wo eine wesentliche Umsetzung oder gar eine Erschöpfung des stofflich zur Verfügung stehenden Materials auszuschließen ist. Demnach ist der Unterschied der initialen Vermehrungsintensitäten ein Ausdruck dafür, daß die verschiedenen Peptonsorten einen verschiedenen Gehalt an *Reizstoffen für die Keimvermehrung* aufweisen.

Die Wirkung dieser Reizstoffe erstreckt sich nach unseren Erfahrungen ausschließlich auf jene Periode der Vermehrung, welche — nach *Buchanan*[1] — als logarithmische Phase bezeichnet wird. Mit fortschreitendem Alter der Kulturen dürften andere Einflüsse, wie die Erschöpfung der Energie- und Stoffquellen, Anhäufung von Stoffwechselendprodukten, Verschiebungen der H-Ionenkonzentration, bestimmend

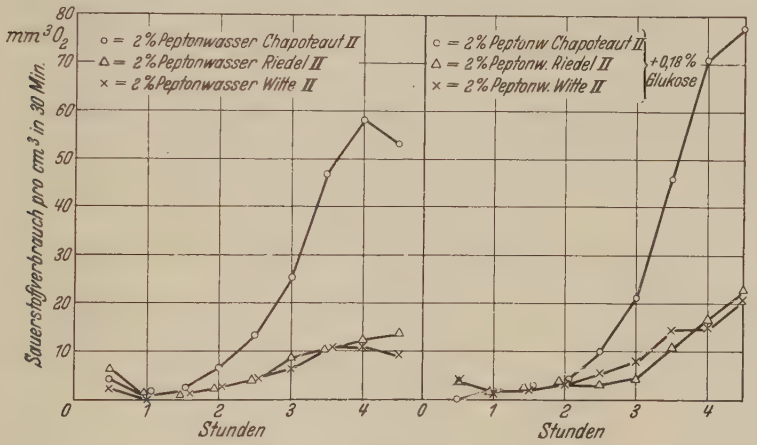

Abb. 4.

auf die endliche Keimzahl einwirken. Vergleichende Versuche haben ergeben, daß bereits nach 20 Stunden der initiale Effekt von Reizstoffen nicht mehr nachzuweisen ist.

Hinsichtlich der physiologischen Bedeutung des Peptons als Nährsubstrat für Staphylokokken ergibt sich, daß neben den — von uns experimentell differenzierten — Grundfunktionen als Energiequelle und als Stoffquelle eine dritte an sich entbehrliche Funktion des Peptons nachweisbar ist, die nach Art eines quantitativ wirksamen induktiven Reizstoffes die initiale Vermehrungsgeschwindigkeit der Staphylokokken beeinflußt.

e) Vergleichende Versuche mit anderen stimulierenden Substanzen.

In einigen weiteren Versuchsreihen wurde der stimulierende Einfluß von Substanzen untersucht, deren wachstumfördernde Wirkung bei Zellen bzw. Zellverbänden bereits bekannt ist. Durch Untersuchungen an Pilzen, so z. B. von

[1] Siehe bei *Buchanan* und *Fulmer*, l. c.

Raulin[1], *Richards*[2], *Ono*[3], *H. Tamiya*[4], *E. Bechmann*[5], *M. Roberg*[6], *I. S. McHargue* und *R. K. Calfee*[7], ist erwiesen, daß *Zink-Ionen* innerhalb gewisser Konzentrationen die Entwicklung der Mycelien deutlich fördern. Neuerdings hat *Mary Wotherspoon Colley*[8] ähnliche Wirkung auf die Bakterienvermehrung feststellen können. Auf Anregung von Herrn Professor *Kurt Noack* wurde die Wirkung von Zinksulfat auf die Vermehrung von Staphylokokken in Peptonwasser nachgeprüft.

Die Versuche wurden bei der für die Staphylokokkenzüchtung üblichen H-Ionenkonzentration von p_H 7,4—7,6 vorgenommen, die sich im Verlaufe der Beobachtung — infolge der Ammoniakabspaltung — nach der alkalischen Seite hin etwas verschob. Die von *Tamiya* und von *Bechmann* angegebene Funktion zwischen Zinkkonzentration und p_H-Optimum konnte beim *Staphylococcus aureus* nicht nachgeprüft werden, da dieser in seiner initialen Vermehrung schon bei einer relativ geringen Verschiebung der H-Ionenkonzentration gehemmt wird. Die beiden nachfolgenden Tabellen zeigen die zunehmenden Keimzahlen in 1proz. Lösungen von Pepton Chapoteaut I, denen Zinksulfat in Konzentrationen von mol/100 bis mol/1000000 zugesetzt worden war.

Tabelle 26.

Nach Stunden	1proz. Peptonwasser Chapoteaut I			
	mol/100 $ZnSO_4$	mol/1000 $ZnSO_4$	mol/10,000 $ZnSO_4$	Kontrolle
	Keimzahl in Millionen/ccm			
	p_H	p_H	p_H	p_H
0 (Einsaat)	50 (7,4)	50 (7,4)	50 (7,4)	50 (7,4)
9	30 (7,4)	96 (7,4)	176 (7,4)	184 (7,4)
17	94 (7,4)	318 (7,4)	358 (7,4)	402 (7,4)
49	528 (7,4)	451 (7,4)	629 (7,4)	693 (7,4)
63	661 (7,4)	475 (7,4)	661 (7,4)	640 (7,4)
70	720 (7,6)	549 (7,6)	790 (7,6)	792 (7,6)
88	826 (7,6)	544 (7,8)	864 (7,8)	738 (7,8)
136	912 (8,2)	744 (8,2)	986 (8,2)	992 (8,2)

Nach Stunden	mol/100000 $ZnSO_4$	mol/500000 $ZnSO_4$	mol/1000000 $ZnSO_4$	Kontrolle
	Keimzahl in Millionen/ccm			
	p_H	p_H	p_H	p_H
0 (Einsaat)	50 (7,6)	50 (7,6)	50 (7,6)	50 (7,6)
7	227 (7,6)	256 (7,6)	256 (7,6)	233 (7,6)
15	443 (7,6)	555 (7,6)	459 (7,6)	451 (7,6)
50	608 (7,6)	816 (7,6)	512 (7,6)	528 (7,6)
120	908 (7,8)	880 (7,8)	850 (7,8)	900 (7,8)

[1] *Raulin*, Ann. des Sci. natur. **5**, Ser. 11, 93 (1869).
[2] *Richards*, Jb. Bot. **30**, 66 (1897).
[3] *Ono*, Zbl. Bakter. II Orig. **9**, 154 (1902).
[4] *H. Tamiya*, Acta phytochim. (Tokyo) **4**, 105 (1928).
[5] *E. Bechmann*, Z. Bot. **22**, H. 6 (1929).
[6] *M. Roberg*, Zbl. Bakter. II Orig. **84**, 196 (1931).
[7] *I. S. McHargue* und *R. L. Calfee*, Bot. Gaz. **91**, 183 (1931).
[8] *M. Wotherspoon Colley*, Amer. J. Bot. **18**, 266 (1931).

Der Zusatz von Zinksulfat in Konzentrationen zwischen 10^{-2} und 10^{-6} mol übt keinen fördernden Einfluß auf die initiale Vermehrung und auf die endlich erreichten Keimzahlen von Staphylokokken in Peptonwasser aus. Es ist lediglich bei 10^{-2} und 10^{-3} mol eine anfängliche Hemmung der Keimvermehrung festzustellen, die sich bald wieder ausgleicht. Immerhin ist in diesen Versuchen die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß die zur Verwendung gelangten Nährlösungen bereits mit aus dem Glase stammenden Zinkionen verunreinigt waren. Um diese Fehlerquelle auszuschalten, wurde — da eine genügende Anzahl von Quarzkolben nicht zur Verfügung stand — folgende Versuchsanordnung gewählt: Die vorher im Trockenschrank sterilisierten Zuchtgefäße, Trichter, Pipetten usw. wurden vollständig mit sterilisiertem Paraffin ausgegossen. Das (trockene) Peptonpulver wurde wiederholt bei 60° sterilisiert. Das zum Lösen des Peptons und der Mineralsalze verwendete Wasser war durch ein Quarzrohr in einen paraffinierten Kolben überdestilliert worden. Die Lösungen mußten naturgemäß kalt bereitet werden. Auf diese Weise wurde eine Verunreinigung der Nährlösungen durch Zinkionen so gut wie ausgeschlossen. Trotzdem eine nochmalige Sterilisation nicht möglich war, stellten die — wie oben mit $50 \cdot 10^6$ Keimen pro Kubikzentimeter beimpften — Ansätze schließlich Reinkulturen dar. Aus der nachfolgenden Tab. 27 geht hervor, daß auch bei den gewählten Kautelen eine stimulierende Wirkung von 10^{-4} und 10^{-6} mol Zinksulfat auf die Vermehrung von Staphylokokken nicht nachzuweisen ist.

Tabelle 27.

Nach Stunden	1 proz. Peptonwasser Chapoteaut I		
	mol/10000 $ZnSO_4$	mol/1000000 $ZnSO_4$	Kontrolle
	Keimzahl in Millionen/ccm		
0 (Einsaat)	50	50	50
14	420	480	450
48	620	648	666
120	900	940	912

Weiterhin wurde die Wirkung von *Progynon* (Schering) auf die Keimvermehrung an *Staphylococcus aureus* geprüft. Die Untersuchung wurde in 2 proz. Lösung von Pepton Chapoteaut I durchgeführt. Es wurde so viel von einer Lösung krystallisierten Progynons hinzugefügt, daß in 100 ccm des Nährmediums 200 Mäuseeinheiten Progynon enthalten waren. Eine Steigerung der Keimvermehrung war gegenüber den Kontrollen nicht festzustellen.

VII. Der Einfluß der Belüftung auf die Vermehrung von Staphylococcus aureus in reinen Peptonlösungen.

Der experimentelle Nachweis der oxydativen Desaminierung des Peptons bei der energetischen Ausnutzung durch Staphylokokken (und andere Erreger) liefert die chemischen Grundlagen für die Unerläßlichkeit des Luftsauerstoffes bei dieser Umsetzung. Wir haben bereits darauf hingewiesen (S. 467), daß selbst Schichthöhen von nur 7—8 mm noch zu hoch sind, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung durch einfache Diffusion der überstehenden Luft zu gewährleisten. Wir konnten ferner zeigen, daß die maximale Ausnutzung der vorhandenen freien

Aminogruppen, d. h. eine hinsichtlich der Theorie 100proz. Ammoniakproduktion, nur bei Züchtung im Sauerstoffstrom möglich ist (siehe Tab. 11).

Die grundsätzliche Bedeutung der Sauerstoffzufuhr für die Vermehrung von *Staphylococcus aureus* auf reinen Peptonlösungen geht aus nachfolgenden vergleichenden Versuchen hervor, in welchen die Keimzahlen von nicht belüfteten und belüfteten Kulturen auf Peptonwasser verschiedener Konzentration laufend festgestellt wurden.

Die Züchtung wurde in 1 l-Jenaer-Stehkolben vorgenommen. Die Belüftung und die Entnahme geschah auf folgende Weise (siehe Abb. 5): Der Sauerstoff wird durch ein Reduzierventil einer Bombe entnommen und durch Passage einer Waschflasche mit konzentrierter Schwefelsäure und eines nachgeschalteten Wattefilters ammoniak- und keimfrei gemacht. Der Gasstrom tritt durch das Zuleitungsrohr (*A*), das durch einen dreifach durchbohrten Gummistopfen bis auf den Boden führt, in den Kolben ein und verläßt ihn nach Durchperlen der Kulturlösung durch das kurze gerade Auslaßrohr (*B*). Das Auslaßrohr trägt einen kleinen Gummistopfen, über den ein Reagensglas mit seitlichem Ansatz und Wattefilter gestülpt ist. Diese Anordnung verhindert eine Verunreinigung durch zurückfließendes Kondenswasser und dient gleichzeitig zur Beimpfung. Zur Entnahme von Kulturlösung wird das Auslaßrohr durch einen Quetschhahn (Q_1) verschlossen, so daß der Überdruck nunmehr die Flüssigkeit — nach Art eines Syphons — durch das Entnahmerohr (*C*) drückt. Das Entnahmerohr führt in eine kleine Glasbirne mit einer innen eingeblasenen Spitze (S_1), durch welche die herausgedrückte Flüssigkeit gewissermaßen in einen sterilen Vorhof eintritt, um dann durch eine (abflammbare) Quarzspitze (S_2) auszufließen. Nach Beendigung der Entnahme wird die Quarzspitze durch den Quetschhahn (Q_2) abgesperrt und darauf sofort der Überdruck im Kolben durch Öffnen des Quetschhahnes (Q_1) ausgeglichen. Die in das Entnahmerohr zurückströmende Luft tritt durch einen seitlichen Ansatz (*R*) der Glasbirne (durch Watte filtriert) steril ein. Es ist zweckmäßig, die an dem dreifach durchbohrten Gummistopfen in einem Stück festmontierte Belüftungs- und Entnahmevorrichtung im Dampftopf für sich zu sterilisieren und dann erst auf den mit steriler Kulturlösung gefüllten Züchtungskolben aufzusetzen, da sonst leicht ein Aufsteigen der Flüssigkeit in die Watte-Luftfilter erfolgt.

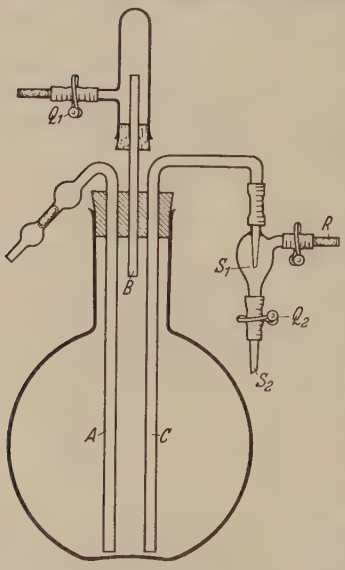

Abb. 5.

Die Tab. 28 zeigt die fortlaufende Vermehrung von Staphylokokken in 0,5proz. bis 3proz. Lösungen von Pepton Chapoteaut II mit und ohne Sauerstoffbelüftung nach einer Einsaat von $5 \cdot 10^6$ Keimen pro Kubikzentimeter.

Tabelle 28.

Nach Stunden		Peptonkonzentration			
		0,5%	1%	2%	3%
		Keimzahl in Millionen/ccm			
14	belüftet . . .	2340	512	2656	1114
	unbelüftet . .	232	288	290	400
22	belüftet . . .	2664	3830	4185	2600
	unbelüftet . .	344	374	416	552
40	belüftet . . .	2695	5490	8690	5700
	unbelüftet . .	640	650	838	1345
50	belüftet . .	2700	5500	11800	9180
	unbelüftet . .	950	976	1504	1900

Unabhängig von den Peptonkonzentrationen sind in den belüfteten Kulturen durchweg höhere Keimzahlen zu finden als in den unbelüfteten. Demnach ist die Ausnutzung des Nährmaterials bei mangelhafter Sauerstoffversorgung ungenügend, und dementsprechend ist die Abstufung der nach 50 Stunden oder vorher erreichten Keimzahlen zwar nachweisbar, aber keineswegs den verschiedenen Nährstoffkonzentrationen proportional. Ähnliche Beobachtungen konnten wir bereits oben (s. S. 467) anführen, wo eine Abstufung der Keimzahlen in reinen Peptonlösungen verschiedener Konzentrationen kaum, jedoch nach Zusatz von — anoxybiontisch ausnutzbarer — Glykose deutlich in Erscheinung trat. In den belüfteten Ansätzen verhalten sich die nach 50 Stunden erreichten Keimzahlen für die 0,5proz., 1proz. und 2proz. Konzentration — diesen entsprechend — praktisch wie 1:2:4. Das vorhandene Nährsubstrat wird eben sehr weitgehend umgesetzt, und dabei werden außerordentlich hohe Keimzahlen erreicht. Der relative Abfall der Keimzahl in der 3proz. Peptonlösung dürfte vielleicht durch eine Hemmung hervorgerufen sein, wie sie auch schon oben (s. Abb. 1) bei Pepton Riedel II und Pepton Witte II — selbst nach Zusatz von Traubenzucker — beobachtet werden konnte. Das Zurückbleiben der Keimzahlen in den belüfteten 1proz. und 3proz. Kulturen während der ersten 14 Stunden war durch ein Nachlassen der Belüftungsgeschwindigkeit bedingt. Dieses technische Mißgeschick, dessen Effekt schnell wieder ausgeglichen wurde, liefert einen weiteren Beitrag zur Bedeutung der Belüftungsintensität für die Keimvermehrung auf Pepton.

In der schon erwähnten Mitteilung „über den Sauerstoffverbrauch bei der Keimvermehrung“[1] haben wir darauf hingewiesen, daß unter den üblichen Züchtungsbedingungen aerober Bakterien die Diffusions-

[1] *J. Hirsch* und *A. W. Müller*, l. c.

geschwindigkeit in flüssigen Nährmedien nicht ausreicht, um den zunehmenden Sauerstoffbedarf für eine maximale Keimvermehrung zu decken[1].

Aus den bei der Züchtung in Barcroft-Warburg-Gefäßen gewonnenen Erfahrungen ging der hemmende Effekt größerer Schichthöhen hervor. Damit gewinnt die Ausdehnung der Berührungsflächen zwischen Flüssigkeit und überstehender Atmosphäre — bei einer gegebenen Schichthöhe — für die Sauerstoffversorgung der Keime eine überragende Bedeutung. Von diesem Gesichtspunkt aus mußte die Wirkungsweise der Durchlüftung von flüssigen Kulturen mittels Luft- oder Sauerstoffstromes beurteilt werden. Wir sind der Ansicht, daß selbst bei einer relativ großen Durchlüftungsgeschwindigkeit — in der in Abb. 5 beschriebenen Anordnung — der vermehrungssteigernde Effekt nur zu einem geringen Teil darauf beruht, daß die durchperlenden Gasblasen direkt als Sauerstoffquelle für die Kultur dienen. Eine einfache Schätzung ergibt, daß die durch die Gasblasen neu geschaffenen Grenzschichten zwischen Gas und Flüssigkeit im Vergleich zur vorhandenen Berührungsfläche mit der überstehenden Atmosphäre kaum so groß sind, daß damit der vielfache Vermehrungseffekt erklärt werden könnte. Die Wirkungsweise der Durchlüftung scheint im wesentlichen mechanischer Natur zu sein. Durch die ständige Bewegung der Flüssigkeit werden immer neue Schichten mit der überstehenden Atmosphäre in Berührung gebracht, und damit wird die durch die Vermehrung bedingte Verarmung der Lösung an Sauerstoff schneller ausgeglichen[2]. Es ist weiterhin zu beachten, daß für die jeweils an den Flüssigkeitsspiegel herangebrachten Bakterien der Diffusionsweg des Sauerstoffs auf ein Minimum reduziert wird. Damit nähert sich die Sauerstoffversorgung den Bedingungen, wie sie in Oberflächenkulturen auf festen Nährböden gegeben sind, auf welchen erfahrungsgemäß bei den meisten aeroben Mikroorganismen wesentlich größere Ernten erzielt werden als in gewöhnlichen (unbelüfteten) Nährlösungen.

Es lag nahe, die Zusammenhänge zwischen mechanischer Bewegung, Sauerstoffversorgung und Vermehrung aerober Erreger einer quantitativen Untersuchung zu unterziehen. Zu diesem Zweck wurde eine besondere Züchtungsapparatur ausgearbeitet, welche — unter sterilen Verhältnissen — eine dosierte Bewegung der Nährflüssigkeit gestattete und außerdem noch die Möglichkeit einer Gasdurchströmung bot. Wenn

[1] Ähnliche Beobachtungen über die Beziehungen zwischen Schichtdicke, Sauerstoffversorgung und Keimvermehrung hat *O. Rahn* [Zbl. Bakter. II Orig. **35**, 429 (1912)] bei Untersuchungen über „die Bakterientätigkeit im Boden als Funktion von Korngröße und Wassergehalt" erhoben.

[2] Ein derartiger Effekt dürfte auch durch den von *F. Weleminsky* und *E. Butschowitz* [Zbl. Bakter. I Orig. **104**, 443 (1927)] angegebenen Apparat zur Züchtung von Bakterien in strömenden Nährböden (Cirkulator) erzielt werden.

auch wegen äußerer Verhältnisse die Bearbeitung dieser Aufgabe nicht durchgeführt werden konnte, so soll doch wenigstens die Apparatur beschrieben und eine der damit durchgeführten Versuchsreihen mitgeteilt werden. Die Abb. 6 zeigt die Anordnung der Züchtungsapparatur.

Ein 1 l-Jenaer-Rundkolben mit weitem, kurzen Hals trägt in einem Gummistopfen die Rührvorrichtung für einen Glasrührer (*R*), dessen Doppelflügel in einer Glasgabel umlegbar ist. Um eine Infektion durch die Drehachse zu vermeiden, wird eine Stopfbüchse verwendet (*S*), welche aus einem System von drei ineinandergreifenden Messingrohren besteht. Das äußere Rohr trägt die Riemenscheibe und ist durch einen dickwandigen Gummischlauch (*G*) mit dem Rührer verbunden. Weiterhin trägt der Gummistopfen das gegen Luftinfektion (wie schon S. 480 beschrieben) gesicherte Auslaßrohr (*A*). Die am Gummistopfen befestigte Vorrichtung kann auf einem leeren Kolben für sich im Dampftopf sterilisiert werden. Die Sauerstoffzuführung zum Züchtungskolben erfolgt durch ein seitlich eingeschmolzenes Zuführungsrohr (*B*). Die Entnahme wird durch ein zweites eingeschmolzenes Rohr (*C*) vorgenommen, das mit einer kurzen Bürette (*D*) verbunden ist. Durch Ansaugen am Mundstück (*E*) wird Kulturflüssigkeit in die Bürette hochgesaugt und verläßt sie durch einen Auslauf (*F*), der in ähnlicher Weise wie schon (Abb. 5) beschrieben, gegen Luftinfektion gesichert ist. Alle Gaszulaß- und Auslaßrohre sind mit Watteluftfiltern versehen. Zur Bebrütung dient ein Wasserthermostat.

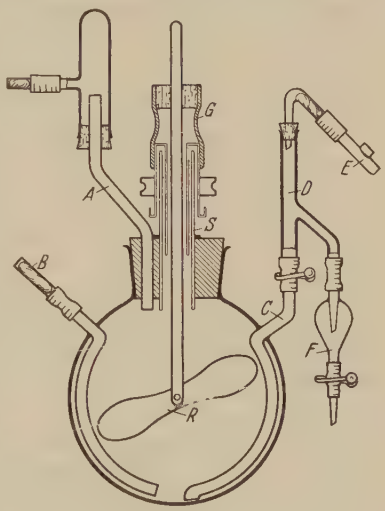

Abb. 6.

In der nachfolgenden Tab. 29 und Abb. 7 sind die zunehmenden Keimzahlen einer Staphylokokkenkultur dargestellt. Eine 2proz. Lösung von Pepton Chapoteaut II wurde mit $50 \cdot 10^6$ Keimen pro Kubikzentimeter beimpft und bei 37° bebrütet. Die Züchtung erfolgte in der beschriebenen Apparatur bei lebhafter Sauerstoffdurchströmung und bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit des Rührers von etwa 300 Umdrehungen pro Minute.

Unter den Bedingungen einer intensiven Sauerstoffversorgung steigt die Keimzahl innerhalb der ersten 4 Stunden steil an, danach nimmt die Vermehrungsintensität schnell ab. Der steile auf 4 Stunden zusammengedrängte logarithmische Anstieg entspricht durchaus dem Bilde, wie wir es nur unter den optimalen Bedingungen der Belüftung in bewegten Bacroft-Warburg-Gefäßen bei der Bestimmung des zunehmenden Sauerstoffverbrauches erhielten.

Durch Abstufung der Rührgeschwindigkeit — mit und ohne Sauerstoffbelüftung — dürfte sich in vergleichenden Versuchen die Wirkung der Flüssigkeitsbewegung auf die Vermehrungsintensität verfolgen

lassen. Inwieweit durch die Bewegung eine schnellere Entfernung hemmender Stoffwechselendprodukte aus der unmittelbaren Umgebung der Keime bewirkt wird, könnte durch Ermittlung der Vermehrungsgeschwindigkeit unter den Bedingungen der fakultativen

Tabelle 29.

Nach Std.	Keimzahl/ccm Millionen
0	50
2	240
3	496
4	888
8	1026

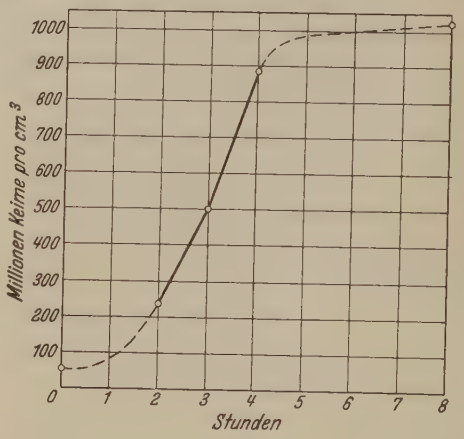

Abb. 7.

Anaerobiose — bei Zusatz von Traubenzucker — geprüft werden. Diese und ähnliche Fragestellungen müssen späteren Versuchen vorbehalten bleiben.

VIII. Zur physiologischen Bedeutung der sogenannten Extraktivstoffe in peptonhaltiger Nährbouillon.

Nährlösungen, die außer Mineralsalzen lediglich Pepton enthalten, werden in der Praxis des bakteriologischen Laboratoriums nur in seltenen Fällen (z. B. bei der Choleradiagnose) benutzt. Zumeist wird das Pepton zusammen mit Fleischwasser, welches die aus Muskelfleisch extrahierbaren organischen und anorganischen Bestandteile enthält, als sog. „Nährbouillon" verwendet. Nachdem durch die vorhergehenden Versuche mit Peptonwasserkulturen einige Erkenntnisse über die verschiedenen physiologischen Funktionen des Peptons bei der Keimvermehrung gesammelt worden waren, haben wir versucht, auch einige Anhaltspunkte für die Bedeutung der sog. Extraktivstoffe bei der Züchtung von Staphylokokken auf Nährbouillon zu gewinnen.

Nach den angeführten Erfahrungen kann das Pepton hinsichtlich der grundsätzlich wichtigen energetischen und stofflichen Ausnutzbarkeit als ein vollwertiges Nährsubstrat für Staphylokokken angesprochen werden, sofern eine — aus rein chemischen Gründen für die Desaminierung erforderliche — ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet ist. Darüber hinaus konnten wir, besonders für das Handelspräparat

Chapoteaut, eine Wirkungskomponente nachweisen, die für die Einleitung einer kräftigen initialen Vermehrung von wesentlicher Bedeutung ist. Bei dieser Sachlage war es nicht zu erwarten, daß den Extraktivstoffen eine besonders wichtige Funktion in energetischer oder stofflicher Hinsicht zukommt, wobei wir von den mineralischen Bestandteilen des Fleischwassers absehen wollen. Aus den nachfolgenden Versuchsergebnissen geht denn auch hervor, daß die ernährungsphysiologische Bedeutung der Extraktivstoffe in erster Linie auf einer Anregung der Vermehrungsintensität beruht.

Da die Zusammensetzung von Fleischwasser je nach dem Ausgangsmaterial erheblichen Schwankungen unterworfen ist, haben wir zur Prüfung der Wirkungsweise der Extraktivstoffe des Muskelfleisches auf die Vermehrung von Staphylokokken ein Präparat von „Liebigs Fleischextrakt" (für Laboratoriumszwecke) herangezogen. Von diesem Extrakt wurde eine 2proz. Lösung hergestellt; zugleich wurde ein 4proz. Peptonwasser mit einem Zusatz von Phosphatpuffer bereitet. Eine Mischung der beiden Lösungen zu gleichen Teilen ergab eine „Nährbouillon", die somit 1% Liebig-Extrakt und 2% Pepton enthielt. Zum Vergleich wurden durch Zusatz von gleichen Teilen destillierten Wassers die Extraktlösung auf 1% und die Peptonlösung auf 2% verdünnt. Als Peptonpräparat diente eine Charge Pepton Riedel, von der aus früheren Untersuchungen (s. S. 477) bekannt war, daß sie nur wenig Reizstoffe für die initiale Keimvermehrung enthielt. Die vergleichende Untersuchung der Keimvermehrung in den drei Lösungen wurde mit dem Barcroft-Warburg-Apparat durchgeführt, indem als Maßstab für die Zunahme der lebenden Substanz der halbstündliche Sauerstoffverbrauch und weiterhin die endlichen Keimzahlen nach 6 Stunden festgestellt wurden. Die Bebrütung erfolgte bei 37° nach einer Einsaat von $15 \cdot 10^6$ Staphylokokken pro Kubikzentimeter (s. Tab. 30; Abb. 8).

Aus den Werten des Gesamtsauerstoffverbrauchs nach 6 Stunden und aus den entsprechenden Keimzahlen ergibt sich, daß Nährbouillon aus Liebig-Extrakt *und* Pepton die für die Keimvermehrung günstigsten Bedingungen liefert. Hervorzuheben ist, daß die hier erreichten Werte erheblich höher sind als die Summe aus den Sauerstoffmengen sowie aus den Keimzahlen, welche in der gleichen Zeit bei der Züchtung auf den einzelnen Komponenten gefunden werden. In 1proz. Liebig-Extrakt und in 2proz. Peptonwasser werden nach 6 Stunden etwa die gleichen Keimzahlen erreicht, d. h. beide Substrate enthalten für eine Vermehrung bis zu etwa 950 Millionen Keimen pro Kubikzentimeter ausreichende Stoff- und Energiequellen. Der Befund, daß in Liebig-Extrakt fast doppelt so viel Sauerstoff verbraucht wurde wie in Peptonwasser, kann nicht diskutiert werden, da die Art der im Extrakt oxy-

Tabelle 30.

Nach	1% Liebig-Extrakt	2% Peptonwasser (Riedel)	„Nährbouillon" (1% Liebig-Extrakt, 2% Pepton Riedel)
	halbstündlicher Sauerstoffverbrauch pro cmm Kultur cmm O_2 bei 0° und 760 mm Hg		
	cmm	cmm	cmm
1 Stunde	6,6	4,5	5,7
$1^1/_2$ Stunden	1,8	3,3	3,5
2 „	6,2	2,5	8,8
$2^1/_2$ „	10,2	5,7	17,2
3 „	17,2	8,2	28,1
$3^1/_2$ „	19,0	13,1	44,9
4 „	24,6	12,1	78,7
$4^1/_2$ „	28,1	11,9	116,3
5 „	29,9	15,6	99,4
$5^1/_2$ „	32,8	17,4	95,3
6 „	29,8	15,9	73,0
Gesamt-O_2-Verbrauch nach 6 Stunden	206,2 cmm	110,2 cmm	570,9 cmm
Keimzahl pro Kubikzentimeter nach 6 Stunden	$952 \cdot 10^6$	$935 \cdot 10^6$	$4309 \cdot 10^6$
Gesamt-O_2-Verbrauch für eine Ernte von $1 \cdot 10^9$ Keimen	217 cmm	118 cmm	135 cmm

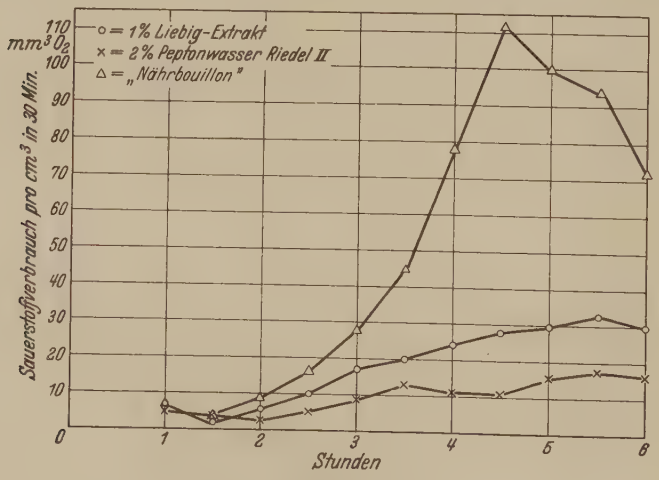

Abb. 8.

dierten Stoffe nicht bekannt ist und infolgedessen der energetische Wert der Oxydation nicht festzustellen ist.

Dagegen besteht für die beiden Substrate Peptonwasser und „Nährbouillon" eine einigermaßen konstante Relation zwischen Gesamt-

sauerstoffverbrauch und erreichter Keimzahl: Der Gesamtsauerstoffverbrauch für eine Ernte von einer Milliarde Keime beträgt im Peptonwasser 118 cmm, in „Nährbouillon" 135 cmm. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, daß in beiden Medien für die Zunahme der lebenden Substanz ein und dieselbe Energiequelle, nämlich die Aminogruppen des Peptons, verwendet worden ist. Wäre in der „Nährbouillon" ein wesentlicher Teil des Liebig-Extraktes zur energetischen Dissimilation herangezogen worden, so müßte hier — entsprechend dem Sauerstoffwert von 217 cmm für $1 \cdot 10^9$ Keime in reiner Fleischextraktlösung — ein wesentlich höherer Wert als der von 135 cmm erreicht worden sein.

Die überraschend große Steigerung des zunehmenden Sauerstoffverbrauches und der endlich erreichten Keimzahlen, die beim Zusammenwirken beider Komponenten in der „Nährbouillon" auftritt, und die über einen reinen Additionseffekt weit hinausgeht, dürfte weniger auf das Pepton zurückzuführen sein als auf Faktoren, die im Fleischextrakt enthalten sind. Für die kurze Spanne von $4^1/_2$ Stunden sind in der 2proz. Peptonlösung fraglos ausreichende Mengen von desaminierbaren NH_2-Gruppen und von assimilatorisch ausnutzbarem Material vorhanden. Andererseits geht aus den oben (S. 477) mitgeteilten Befunden hervor, daß Pepton Riedel II — z. B. im Vergleich zu Pepton Chapoteaut II — relativ arm an vermehrungsfördernden Reizstoffen ist. Somit dürfte die stimulierende Komponente der „Nährbouillon" im Fleischextrakt enthalten sein. Die Wirkung dieser Stimulation tritt bereits unmittelbar nach der Latenzperiode auf. Es liegt somit ein induktiver Effekt vor, wie wir ihn schon bei der Reizwirkung von Pepton Chapoteaut II beschrieben haben.

Diese physiologische Bedeutung der sog. Extraktivstoffe des Muskelfleisches für die Vermehrung von Staphylokokken in peptonhaltiger Nährbouillon geht weiterhin aus Versuchen hervor, in denen als „Fleischwasser" eine Lösung von „Maggis gekörnter Fleischbrühe" verwendet wurde. Um den Staphylokokken eine einheitliche Energiequelle zu bieten, und so den etwaigen Einfluß verschiedenwertiger Brennstoffe auszuschalten, wurde zu allen Ansätzen (mit Ausnahme einer Kontrolle) durchweg 0,5% Glykose zugesetzt.

Zur Gewinnung einer klaren Lösung des Maggi-Präparates wurde die erforderliche Menge mit destilliertem Wasser im Dampftopf erhitzt, nach dem Erkalten von der erstarrten Fettschicht befreit, filtriert und dann sterilisiert.

Die Ansätze der Versuchsreihe wurden in entsprechender Weise wie im vorstehenden Versuch bereitet; ihre Zusammensetzung ist in der nachfolgenden Tabelle angeführt. Die mit $15 \cdot 10^6$ Keimen pro Kubikzentimeter beimpften Lösungen wurden bei 37° gehalten (s. Tab. 31; Abb. 9).

Tabelle 31.

Nach	1% Maggis gekörnte Fleischbrühe	1% Maggis gekörnte Fleischbrühe + 0,5% Glykose	2% Pepton Riedel II + 0,5% Glykose	„Nährbouillon" 1% Maggis gekörnte Fleischbrühe + 2% Pepton + 0,5% Glykose
	halbstündlicher Sauerstoffverbrauch/ccm Kultur ccm O_2 bei 0° und 760 mm Hg			
	cmm	cmm	cmm	cmm
1 Stunde	0,4	1,1	1,3	3,1
$1^1/_2$ Stunden	1,6	2,7	1,3	3,1
2 „	0,4	2,2	0,9	2,1
$2^1/_2$ „	—	1,6	4,0	5,7
3 „	2,0	—	0,9	12,9
$3^1/_2$ „	—	—	3,5	21,2
4 „	0,8	—	6,2	39,9
$4^1/_2$ „	1,6	1,1	10,1	51,8
5 „	0,5	—	13,2	70,9
$5^1/_2$ „	0,8	—	15,8	80,3
6 „	—	—	19,0	93,9
$6^1/_2$ „	—	—	23,2	91,4
7 „	—	—	29,0	83,9
Gesamt-O_2-Verbrauch nach 7 Stunden . .	8,1 cmm	8,7 cmm	128,4 cmm	560,2 cmm
Keimzahl pro Kubikzentimeter nach 7 Std.	$< 20 \cdot 10^6$	$< 20 \cdot 10^6$	$1360 \cdot 10^6$	$5780 \cdot 10^6$
Gesamt-O_2-Verbrauch für eine Ernte von $1 \cdot 10^9$ Keimen . . .	—	—	94 cmm	97 cmm

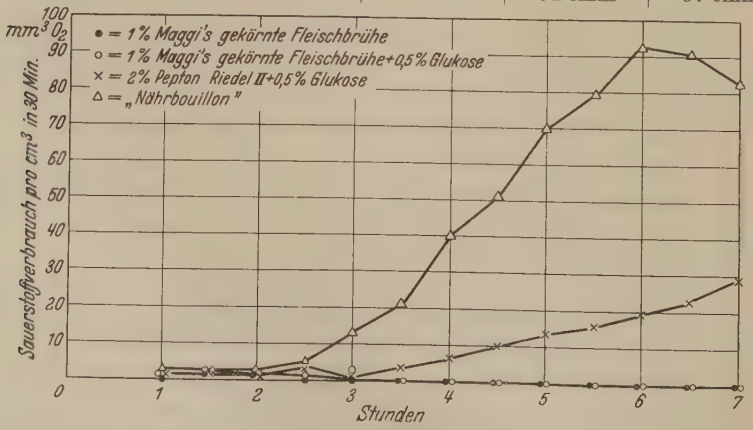

Abb. 9.

Auf einer 1proz. Lösung von Maggis gekörnter Fleischbrühe findet keine Vermehrung statt. Auch nach Zusatz von Brennstoff in Form

von Traubenzucker ist ein Angehen der Staphylokokken nach 7 Stunden nicht festzustellen. Das Ausbleiben der Vermehrung in Gegenwart einer zusätzlichen, sicher brauchbaren Energiequelle spricht dafür, daß die für den Aufbau von Staphylokokkenleibern stofflich notwendigen Anteile in unzureichender Menge vorhanden sind.

Dagegen übt Maggis gekörnte Fleischbrühe eine ausgesprochene stimulierende Wirkung auf die Vermehrung von Staphylokokken aus, wenn sie nämlich zusammen mit Pepton als „Nährbouillon" verwendet wird. In einer solchen „Nährbouillon", welcher im vorliegenden Versuch aus Gründen einer gleichartigen Energieversorgung Glykose zugesetzt war, werden Keimzahlen erreicht, die ein Vielfaches der Ernte aus einer Vergleichslösung von glykosehaltigem Peptonwasser betragen.

Die angeführte Versuchsreihe ermöglicht es, die physiologische Bedeutung der in der glykosehaltigen „Nährbouillon" vorhandenen Komponenten im einzelnen gegeneinander abzugrenzen. Als *Energiequelle* dient ausschließlich die Glykose; denn wir wissen, daß die Glykose gegenüber Pepton als Energiequelle bevorzugt wird, und es ist anzunehmen, daß das gleiche auch gegenüber den etwa vorhandenen energieliefernden Stoffen im Maggi-Präparat gilt. Eine experimentelle Stütze für diese Annahme liefert die übereinstimmende Relation zwischen Sauerstoffumsatz und erreichter Keimzahl in Traubenzucker-Nährbouillon und im zuckerhaltigen Peptonwasser. Die beiden Werte von 94 cmm bzw. 97 cmm Sauerstoff, der für eine Ernte von 1 Milliarde Keimen insgesamt benötigt wurde, zeigen, daß hier wie dort ein und dasselbe Material, nämlich Glykose, energetisch ausgenutzt wurde.

Damit wird die Verwendung des Peptons in der zuckerhaltigen „Nährbouillon" auf die assimilatorische Funktion beschränkt. Das Pepton dient hier lediglich als *Stoffquelle* für die Staphylokokkenvermehrung, und zwar als einzige Stickstoffquelle; denn Maggis gekörnte Fleischbrühe bietet kaum die für eine Vermehrung der Staphylokokken notwendigen Baustoffe, wie die Parallelansätze der reinen Lösung und der zuckerhaltigen Lösung zeigen.

Für die physiologische Bedeutung des Maggi-Präparates in der „Nährbouillon" bleibt schließlich nur der außerordentlich wirksame *stimulierende Effekt* auf die Vermehrung der Staphylokokken. Diese Wirkung besteht in einer initial einsetzenden Anregung des Stoff- und Energiewechsels, die zu einer schnelleren und intensiveren Ausnutzung der gegebenen Stoff- und Energiequellen und damit zu einer Steigerung der Bakterienernten innerhalb der Beobachtungszeit führt.

Die Abgrenzung der physiologischen Funktionen der in glykosehaltiger „Nährbouillon" enthaltenen Komponenten gewährt einen gewissen Einblick in die Wirkungsweise dieses für die bakteriologische Praxis fast unentbehrlichen Nährmediums. Vor allen wird ein hin-

länglich schlüssiger Beweis für die anregende Wirkung der Extraktivstoffe des Muskelfleisches auf die vitalen Leistungen der Mikroorganismen geliefert.

Mehr möchten wir aus den Versuchen mit Liebigs Fleischextrakt und mit Maggis gekörnter Fleischbrühe nicht folgern. Zur weiteren Klärung des beschriebenen Stimulationseffektes bedarf es noch einer großen Reihe von Untersuchungen, in welchen vor allem eine chemische Fraktionierung bzw. Isolierung der auf die Vermehrungsgeschwindigkeit wirkenden Stoffe angestrebt werden soll. Auf jeden Fall scheint für die Bearbeitung dieser Fragen die von uns gewählte Versuchsanordnung durchaus geeignet zu sein.

IX. Allgemeine Ergebnisse.

Die vorstehenden Untersuchungen über den Peptonumsatz durch *Staphylococcus aureus* liefern einen Beitrag zur Kenntnis der physiologischen Bedeutung dieses für die Bakterienzüchtung außerordentlich wichtigen Eiweißabbauproduktes. Aus den einzelnen experimentellen Befunden lassen sich die folgenden allgemeinen Ergebnisse ableiten.

1.

Die Ausnutzbarkeit des Peptons bei der Keimvermehrung ist nicht auf seine stoffliche Verwertung als Stickstoffquelle für den Aufbau von Zelleiweiß beschränkt. Ebenso bedeutsam ist — bei Abwesenheit anderer energetisch ausnutzbarer Substanzen — die Funktion des Peptons als Quelle der Energie, welche für die vitalen Leistungen der Mikroorganismen erforderlich ist. Bei der Beurteilung des bakteriellen Peptonumsatzes muß zwischen diesen beiden Funktionen scharf unterschieden werden.

2.

Von chemischen Umwandlungen, die sich bei der Entwicklung einer Bakterienkultur an dem Pepton vollziehen, ist seit langem die Aufspaltung der höheren Molekülverbände in Peptide bzw. in Aminosäuren bekannt. Die Zerlegung komplexer Eiweißabbauprodukte in nächst niederen Stufen hat hinsichtlich der Ausnutzung nur die Bedeutung einer Vorbereitung für die weitere Verwertung der Spaltprodukte sowohl im Stoffwechsel wie auch im Energiewechsel. Die Aufspaltung höher molekularer Bestandteile des Peptons verläuft auf dem Wege der Hydrolyse und wird durch die entsprechenden freien oder an den Zelleib gebundenen Fermente (Proteasen, Tryptasen, Peptidasen) katalysiert. Der spezifische Charakter dieser Hydrolasen und die Frage nach ihrem Vorkommen bei den verschiedenen Erregern haben eine erhebliche Bedeutung für die Praxis der Bakterienzüchtung und für die bakteriologische Differentialdiagnose. Wesentlich für den

Energiegewinn sind ihre Wirkungen nicht, da sie ohne verwertbare Wärmetönung verlaufen.

Eine wichtige Umsetzung des Peptons durch Bakterien, über welche zahlreiche Beobachtungen vorliegen, führt zur Abspaltung von Ammoniak. Es ist bekannt, daß diese Ammoniakproduktion durch die Gegenwart von Traubenzucker sehr stark, meist sogar vollkommen gehemmt wird. Im Hinblick auf die Bedeutung der Kohlehydrate als Energiequelle für vitale Leistungen ergibt sich hieraus ein Hinweis, daß die Entstehung von Ammoniak mit einer energetischen Verwertung des Peptons zusammenhängt.

3.

Zur Klärung der Frage nach dem Chemismus der Ammoniakbildung aus Pepton gingen wir von früheren Ergebnissen aus, welche die Umsetzung der l-Asparaginsäure durch den *Vibrio cholerae* betreffen. Danach stellt der Abbau der l-Asparaginsäure durch den Choleraerreger einen oxydativen Prozeß dar, der zu den Endprodukten Ammoniak, Essigsäure und Kohlensäure führt. Es konnte nun gezeigt werden, daß eine Vermehrung von *Staphylococcus aureus* auf reinem Peptonwasser — ebenso wie die des *Vibrio cholerae* auf Asparaginsäurelösung — nur in Gegenwart von Luftsauerstoff stattfindet, wobei hier wie dort Ammoniak abgespalten wird. Es lag deshalb nahe, anzunehmen, daß die Ammoniakbildung aus Pepton auf dem gleichen Wege wie aus Aminosäuren erfolgt, nämlich durch oxydative Desaminierung der freien Aminogruppen.

Zur Bestätigung dieser Annahme wurde in verschiedenen käuflichen Peptonpräparaten der Gehalt an freien Aminogruppen bestimmt. In ausgedehnten Versuchsreihen konnte festgestellt werden, daß bei der Vermehrung von *Staphylococcus aureus* niemals mehr Ammoniak entsteht als durch Abspaltung der jeweils dargebotenen Aminogruppen entwickelt werden konnte. Beim *Staphylococcus aureus* ist demnach die maximale Ausbeute an Ammoniak durch die Menge der freien Aminogruppen begrenzt. Eine weitere Versuchsreihe, in der das gebildete Ammoniak und die gleichzeitig verschwundenen Aminogruppen quantitativ ermittelt wurden, ergab eine vollkommene Äquivalenz beider Werte und lieferte damit den direkten Beweis für die unmittelbare und ausschließliche Entstehung des Ammoniaks aus den freien Aminogruppen des Peptons.

Wir möchten annehmen, daß die Entstehung von Ammoniak aus Pepton auch bei anderen aeroben Mikroorganismen lediglich durch Desaminierung von Aminogruppen erfolgt. Bei vielen Erregern dürfte jedoch der Umfang der Ammoniakproduktion die Menge der ursprünglich vorhandenen Aminogruppen überschreiten; es handelt sich hierbei um Mikroben, die im Gegensatz zu *Staphylococcus aureus* imstande

sind, durch hydrolytische Spaltung von peptidartigen Bindungen neue Aminogruppen aus Pepton freizulegen. Nach Befunden an Staphylokokkenkulturen auf Peptonwasser, die mit Luftkeimen verunreinigt waren, besitzt der *Bacillus subtilis* derartige enzymatische Fähigkeiten, während *Sarcina lutea* mangels spezifischer hydrolysierender Enzyme — ebenso wie *Staphylococcus aureus* — bei der Ammoniakproduktion aus Pepton auf die Zahl der in der Ausgangslösung vorhandenen freien Aminogruppen angewiesen ist.

4.

In Kulturen von *Staphylococcus aureus* auf Peptonwasser verschiedener Konzentration werden — bei genügender Sauerstoffversorgung — Keimzahlen und Ammoniakmengen gefunden, die zu jeder Zeit den angewandten Peptonkonzentrationen proportional sind. Diese quantitative Beziehung zwischen Substratmenge, Bakterienernten und Ammoniakproduktion liefert einen weiteren Hinweis für die prinzipielle Bedeutung der Desaminierung bei der Ausnutzung des Peptons.

5.

Besonders eingehend haben wir uns damit beschäftigt, die verschiedenen physiologischen Funktionen des Peptons bei der Verwertung durch *Staphylococcus aureus* zu differenzieren. Es ist bereits darauf hingewiesen worden, daß bei Darbietung einer anderen, zusätzlichen Energiequelle in Form von Kohlehydraten die Desaminierung des Peptons ausbleibt, und daß damit die energetische Bedeutung der Ammoniakspaltung in hohem Maße wahrscheinlich gemacht wird. Tatsächlich beruht der Energiegewinn aus Pepton in erster Linie auf dem Vorgang der oxydativen Abspaltung der Aminogruppen; denn in sehr verdünnten Peptonlösungen kann der zur Vermehrung unzureichende Gehalt an freien Aminogruppen durch Zusatz von verschiedenen α-Aminosäuren ohne weiteres ergänzt werden. Trotz ihrer energetischen Ausnutzbarkeit genügen die Aminosäuren den stofflichen Bedürfnissen des *Staphylococcus aureus* nicht; auf Aminosäurelösungen geht der Erreger — auch bei Zusatz von Traubenzucker — nicht an.

Die Unerläßlichkeit von Pepton für die Kultur von *Staphylococcus aureus* bezieht sich demnach lediglich auf die assimilatorische Verwertung dieses Eiweißabbauproduktes. Während z. B. Hefen aus einfachen Ammoniumsalzen Eiweiß zu synthetisieren vermögen und Choleravibrionen — als etwas anspruchsvollere Erreger — wenigstens einfache Aminosäuren zum Protoplasmaaufbau benötigen, sind die pyogenen Staphylokokken hinsichtlich ihrer Stickstoffquelle auf höhere Komplexe (Peptide?, Pepton) angewiesen. Erfahrungsgemäß spielt sich der Stoffumsatz bei der Assimilation in einem Umfang ab, der

weit unter der Größenordnung der energieliefernden Umsetzungen liegt. Dementsprechend sind die bei der Züchtung auf reinen Peptonlösungen manifest werdenden Substratveränderungen praktisch ausschließlich auf dissimilatorische Vorgänge zurückzuführen. Das Ausmaß der stofflichen Verwertung des Peptons ist so gering, daß sich der Chemismus der Assimilation der analytischen Ermittlung entzieht. Es ist bisher noch nicht bekannt, und es wird voraussichtlich nicht leicht festzustellen sein, welche Bestandteile oder Umwandlungsprodukte des Peptons zum Aufbau des Zelleibes herangezogen werden. Für den *Staphylococcus aureus* steht nur so viel fest, daß es nicht einfache Aminosäuren sein können.

Die Bedeutung der Peptone für die Bakterienproduktion ist mit ihrer Verwertung als Energie- und Stoffquelle nicht erschöpft. Wir konnten in bestimmten Peptonsorten die Anwesenheit von Stoffen nachweisen, welche die Geschwindigkeit der Keimvermehrung beeinflussen. Wenn sich auch über die Natur dieser Reizstoffe noch nichts aussagen läßt, so kann man ihre Wirkungsweise einigermaßen charakterisieren: am wesentlichsten erscheint die Beschleunigung der initialen Vermehrung.

6.

Für die Vermehrung von *Staphylococcus aureus* auf reinen Peptonlösungen ist die Sauerstoffversorgung von grundsätzlicher Bedeutung. Unter anaeroben Bedingungen geht der Erreger auf Pepton als einziger Stoff- und Energiequelle nicht an. Setzt man Glykose als eine anoxybiontische Energiequelle hinzu, so vermehrt sich der *Staphylococcus aureus* anaerob. Hieraus folgt: Die stoffliche Verwertung des Peptons als Stickstoffquelle ist anoxybiontisch möglich, dagegen kann die energetische Ausnutzung des Peptons nur bei Gegenwart von Sauerstoff erfolgen. Da — nach den vorstehenden Ergebnissen — der Energiegewinn aus der oxydativen Desaminierung der freien Aminogruppen hervorgeht, ist die „obligate" Aerobiose des *Staphylococcus aureus* auf Nährmedien, in denen Pepton die zur Vermehrung notwendige Energie zu liefern hat, chemisch begründet.

In zahlreichen Versuchsreihen wurde die Abhängigkeit der Keimvermehrung von der Intensität der Sauerstoffversorgung nachgewiesen. Als wichtigstes Ergebnis sei hervorgehoben, daß die Sauerstoffversorgung — bei der im Laboratorium üblichen Züchtung in unbelüfteten flüssigen Nährmedien — für eine intensive und maximale Vermehrung aerober Erreger völlig unzureichend ist. Die (physikalische) Diffusion des Sauerstoffs in wässrigen Lösungen verläuft viel zu langsam, um — selbst schon bei Schichthöhen von wenigen Millimetern — den zunehmenden (physiologischen) Sauerstoffbedarf bei der aeroben Keimvermehrung decken zu können. Demnach sind die Ernten aerober Mikroorgansimen

in unbelüfteten Nährlösungen — abgesehen von anderen Faktoren, wie Substrat, Temperatur, Einsaat usw. — stets auch durch die physikalische Konstante der Sauerstoffdiffusion und damit durch die Schichthöhe bestimmt. In diesem Zusammenhang wurde die Wirkungsweise der Belüftung auf die Keimvermehrung eingehender untersucht.

7.

Die Bedeutung der sog. Extraktivstoffe des Muskelfleisches, die in Form von Fleischwasser zusammen mit Pepton als „Nährbouillon" zur Bakterienzüchtung verwendet werden, beruht nach Beobachtungen an „Liebigs Fleischextrakt" und an „Maggi's gekörnter Fleischbrühe" weniger auf dem Gehalt an stofflich oder energetisch verwertbaren Substanzen als auf dem Gehalt an Reizstoffen, die von vornherein die Keimvermehrung steigern.

Lebenslauf

Ich, Adolph W. Müller, wurde als Sohn des Kaufmannes Henri Adolph Müller und seiner Ehefrau Marianne geb. Meyer geboren. Ich bin Jude hamburgischer Staatsangehörigkeit.

Im Jahre 1925 legte ich am Real-Gymnasium zu Berlin-Tempelhof die Reifeprüfung ab. Von 1926—1929 arbeitete ich in verschiedenen Apotheken als Praktikant und Assistent. Darauf studierte ich an der Universität Berlin Pharmazie und Chemie. Im Frühjahr 1931 bestand ich die pharmazeutische Staatsprüfung und das erste chemische Verbandsexamen.

Seit dem Sommersemester 1931 arbeitete ich in der chemischen Abteilung des Hygienischen Institutes der Universität Berlin.

Herrn Geh. Hofrat Prof. Dr. Martin Hahn verdanke ich die Anregung zu dieser Arbeit sowie eine außerordentliche Förderung durch persönliche Ratschläge und die Gewährung eines Arbeitsplatzes im Hygienischen Institut der Universität. Weiterhin bin ich Herrn Prof Dr. Kurt Noack und Herrn Prof. Dr. Julius Hirsch für ihre interessenvolle Unterstützung zu großem Dank verpflichtet.